



**Politecnico
di Torino**

Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale
Ingegneria Biomedica
A.a. 2024/2025
Sessione di Laurea Marzo 2025

Modifiche superficiali di vetri bioattivi e ceramici tramite trattamenti al plasma



Relatori:

Prof.ssa Miola Marta
Prof.ssa Vernè Enrica

Tutor aziendale:

Dott.ssa Costabello Katiuscia

Supervisor:

Dott. Pontillo Kevin

Candidata:

Ventimiglia Rosalinda

Si ringrazia IRIS S.r.l. per il supporto e la collaborazione che, insieme al Politecnico di Torino, hanno reso possibile la realizzazione del presente elaborato.

Un sentito ringraziamento è rivolto alla relattrice, la prof.ssa Marta Miola e alla correlatrice, la prof.ssa Enrica Vernè per la supervisione e la costante disponibilità.

Ringrazio la Dott.ssa Katuscia Costabello per la guida e la collaborazione offerta in azienda.

Un ringraziamento speciale va anche a Kevin Pontillo, per la costante supervisione durante tutto il percorso.

Ringrazio in special modo i miei genitori, per aver reso possibile questo iter e per avermi supportata per tutta la sua durata.

Infine, vorrei ringraziare Cristian, Gianpietro, Vincenzo e Alessia, nonché tutti i miei più cari amici che, fino alla fine, mi hanno sostenuta.

Sommario

Abstract	5
Abstract (english version)	6
Introduzione	7
Ceramici	8
Vetri	10
Vetri inerti	10
Vetroceramici	13
Biomateriali	14
Interazione tra materiali e sistemi biologici	16
Biocompatibilità	16
Ceramici bioinerti	19
Zirconia	19
Bioattività	21
Misura della bioattività	22
Ceramici bioattivi (osteoconduttivi) – Idrossiapatite	24
Sintesi per via umida	24
Reazioni allo stato solido	25
Trattamenti idrotermali	25
HAp densa e porosa	25
Vetri bioattivi	28
Tecniche di produzione dei vetri bioattivi	29
Formazione dello strato di idrossiapatite	30
Biovetri commerciali	31
BoneAlive®(S53P4)	31
Formazione del biofilm batterico	33
Strategie per il trattamento delle infezioni batteriche	35
Utilizzo di ioni con funzione antibatterica	35
Rame	35
Zinco	37
Argento	37
Superfici antimicrobiche	38
Superfici antiadesive (antibiofouling)	38
Superfici battericide	39
Chitosano come materiale antibatterico	42

Proprietà antibatteriche del chitosano	43
Utilizzo del chitosano in ambito biomedico	45
Attivazione e funzionalizzazione di superfici: trattamenti al plasma	48
Generalità del plasma e possibili applicazioni	48
Sorgenti di plasma gassoso	48
Plasma a radiofrequenza con scarica luminosa (<i>radiofrequency glow discharge</i> , rfGD)	50
Plasma a risonanza di ciclotrone elettronico (ECR).	50
Plasma a scarica effetto corona	51
Plasma atmosferico ad arco.....	52
Plasma a pressione atmosferica DBD (<i>dielectric barrier discharge</i>)	53
Plasma ad arco in vuoto	54
.....	55
Tecniche di modifica superficiale al plasma	55
Sputtering e etching al plasma	55
Impianto ionico per immersione al plasma (PIII).....	56
Deposizione al plasma (<i>plasma deposition</i>).....	57
Plasma spraying	59
Effetti della modifica superficiale tramite plasma	61
Morfologia superficiale	61
Effetti del trattamento al plasma su materiali per dispositivi ortopedici	62
Effetto del trattamento al plasma su materiali per dispositivi cardiovascolari	62
Effetto del trattamento al plasma su materiali in ambito dentale	63
Sezione Sperimentale	64
Materiali e metodi	64
Vetri bioattivi	64
Materiali ceramici	65
Funzionalizzazioni al plasma	66
Pretrattamento dei campioni.....	66
Trattamento dei campioni	68
Reattore al plasma a piatti paralleli	68
Torcia al plasma	70
Caratterizzazioni	72
Chimica Superficiale: Spettroscopia FT-IR.....	72
Topografia e rugosità: microscopia confocale a laser ottico	74
Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS	74
Risultati	76

Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS	76
Topografia e rugosità: microscopia confocale a laser ottico	86
.....	92
.....	93
Chimica superficiale: spettroscopia FTIR.....	94
Conclusioni e sviluppi futuri	98
Bibliografia	99

Abstract

Nel settore biomedicale, la sfida principale non è solo garantire la compatibilità biologica dei materiali, ma anche contrastare il rischio di contaminazione batterica, la quale rappresenta una delle principali cause di fallimento degli impianti. In questo campo, la modifica superficiale dei materiali impiantabili è essenziale per migliorare la loro bioattività, l'adesione cellulare e la resistenza alle contaminazioni batteriche.

Tra le tecniche esistenti, il trattamento al plasma si distingue per la possibilità di funzionalizzare le superfici in modo controllato e senza l'utilizzo di solventi chimici, garantendo un miglioramento delle proprietà superficiali senza alterare la struttura del materiale sottostante. Questo metodo consente non solo di pulire e attivare le superfici, ma anche di depositare in modo uniforme rivestimenti bioattivi, rendendolo una soluzione ottimale per applicazioni in implantologia dentale, ortopedia e ingegneria tissutale.

La suddetta tesi si focalizza sull'utilizzo del trattamento al plasma per la deposizione di un coating antibatterico a base di chitosano su vetri bioattivi (SBA2 e S53P4), zirconia parzialmente stabilizzata con ittria e idrossiapatite. È stato scelto il chitosano in quanto biopolimero noto per le sue proprietà antimicrobiche e la sua biocompatibilità.

I trattamenti superficiali tramite plasma sono stati condotti presso i laboratori di IRIS s.r.l. Le attività sperimentali di caratterizzazione sono state svolte presso i laboratori del Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia (DISAT) del Politecnico di Torino. Dopo la preparazione, i campioni sono stati attivati con plasma Ar/O_2 e Ar con acido acrilico somministrato tramite *bubbler*. Successivamente, è avvenuta la fase di coating tramite plasma, utilizzando Ar/He e per somministrare il chitosano in forma vapore. Al fine di realizzare un rivestimento omogeneo sono stati utilizzati e ottimizzati due approcci: reattore al plasma a piatti paralleli e torcia al plasma atmosferico.

Successivamente, sono state svolte le analisi di caratterizzazione dei materiali. In particolare, per individuare la morfologia e la composizione dei materiali, è stato adoperato il microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FE-SEM). In seguito, è stato utilizzato il microscopio confocale a laser ottico per l'analisi topografica e profilometrica. Per investigare la chimica superficiale, è stata poi condotta un'analisi spettroscopica in trasformata di Fourier nell'infrarosso (FTIR).

Dopo numerose prove e ottimizzazioni, è stato infine ottenuto uno strato sottile e uniforme di rivestimento tramite la deposizione al plasma. In un futuro lavoro, si potrebbe proporre di procedere con le stesse condizioni, ed effettuare in seguito prove in soluzione fisiologica simulata (SBF) per verificare la bioattività dei campioni di SBA2 e S53P4. Per valutare il comportamento antibatterico di entrambe le tipologie di materiali, sarebbe infine opportuno procedere con test antiadesivi *in vitro*.

Abstract (english version)

In the biomedical field, the main challenge is not only ensuring the biological compatibility of materials but also counteracting the risk of bacterial contamination, which is one of the leading causes of implant failure. In this context, the surface modification of implantable materials is essential to enhance their bioactivity, cellular adhesion, and resistance to bacterial contamination.

Among the existing techniques, plasma treatment stands out for its ability to functionalize surfaces in a controlled manner without the use of chemical solvents, ensuring an improvement in surface properties without altering the underlying material structure. This method not only enables surface cleaning and activation but also allows for the uniform deposition of bioactive coatings, making it an optimal solution for applications in dental implantology, orthopedics, and tissue engineering.

This study focuses on the application of plasma treatment for the deposition of an antibacterial chitosan-based coating on bioactive glasses (SBA2 and S53P4), yttria-partially stabilized zirconia, and hydroxyapatite. Chitosan was selected as it is a well-known biopolymer with antimicrobial properties and excellent biocompatibility,

the plasma-assisted surface modifications were conducted at the laboratories of IRIS S.r.l. The experimental characterization activities were carried out at the laboratories of the Department of Applied Science and Technology (DISAT) at the Polytechnic University of Turin. After preparation, the samples were activated using Ar/ O₂ and Ar plasma with acrylic acid introduced through a *bubbler* system. Subsequently, the coating phase were performed via plasma treatment using Ar, attempting to introduce chitosan in vapor phase. To achieve a homogeneous coating, two approaches were employed: a parallel plate plasma reactor and an atmospheric plasma torch, with different configurations.

Following the deposition process, material characterization analyses were conducted. In particular, a field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) was used to determine the morphology and composition of the materials. Subsequently, an optical laser confocal microscope was used for topographic and profilometric analysis. Finally, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was performed to investigate the surface chemistry.

After numerous trials and optimizations, a thin and uniform coating layer was obtained. In a future study, it may be proposed to maintain the same condition and subsequently conduct tests in simulated body fluid (SBF) to evaluate SBA2 and S53P4 samples bioactivity. Finally, to assess the antibacterial behaviour of both material types, *in vitro* anti-adhesion tests should be conducted.

Introduzione

La resistenza antimicrobica (AMR) rappresenta una delle principali minacce globali per la salute pubblica e lo sviluppo. Si stima che, a livello globale, la resistenza batterica agli antibiotici abbia influito su 4,95 milioni di decessi nel 2019, di cui 1,27 milioni attribuibili direttamente all'AMR ¹. Tra i principali fattori determinanti per lo sviluppo di patogeni resistenti ai farmaci emergono sicuramente l'uso improprio e l'abuso di antibiotici. L'AMR rende le infezioni più difficili da trattare, aumentando inoltre i rischi associati a procedure chirurgiche, tra cui i tagli cesarei, le sostituzioni d'anca, i trapianti d'organo e altre tipologie di interventi. La ricerca degli ultimi anni si concentra proprio su questo ambito, con l'obiettivo di sviluppare soluzioni innovative in grado di minimizzare l'utilizzo di farmaci antibiotici andando a migliorare l'efficacia mirata dei trattamenti, evitando la ripercussione infettiva e migliorando la qualità di vita del paziente sottoposto al trattamento.

Tra le recenti tecniche che vedono l'impiego delle modifiche superficiali per rendere i materiali *antibiofouling*, o in generale antibatterici, emerge sicuramente la tecnologia al plasma, una metodica multifunzionale nota per fornire la possibilità di modificare la superficie dei materiali senza alterarne le proprietà meccaniche e strutturali. Il plasma può essere utilizzato in diverse configurazioni, sia per migliorare la biocompatibilità dei materiali sia per sterilizzare dispositivi biomedici o modificarne la chimica superficiale tramite l'introduzione di gruppi funzionali. In questo modo, è anche possibile conferire ai materiali trattati proprietà antibatteriche per funzionalizzarne la superficie al fine di migliorare l'adesione di composti antimicrobici, depositare rivestimenti antibatterici o semplicemente per attivare specie reattive.

Nell'ottica dello sviluppo di soluzioni innovative per la funzionalizzazione delle superfici tramite plasma non termico atmosferico per il conferimento di proprietà antibatteriche a materiali nell'ambito dell'ingegneria del tessuto osseo, il suddetto lavoro di tesi mira alla realizzazione di un coating depositato tramite plasma, a base di antimicrobici naturali e biocompatibili, ovvero il chitosano, cercando di realizzare un rivestimento omogeneo e uniforme su vetri bioattivi (SBA2 e S53P4) e materiali ceramici (idrossiapatite e zirconia parzialmente stabilizzata con ittria). I trattamenti effettuati mirano quindi a promuovere i processi osteointegrativi e limitare l'insorgenza di infezioni post-operatorie senza l'impiego di antibiotici.

Ceramici

L'etimologia della parola "ceramica" deriva dal termine greco **keramos**, che significa ceramica o oggetto cotto. Oggi, il termine "ceramica" ha un significato più ampio e include anche materiali come il vetro, le ceramiche avanzate e i sistemi a base di cemento. I ceramici sono generalmente solidi inorganici, sinterizzati attraverso un adeguato trattamento termico e il successivo raffreddamento. Sono legati tramite una combinazione di legami covalenti, ionici e raramente metallici. I materiali ceramici possono essere cristallini, parzialmente cristallini o non cristallini. Le ceramiche cristalline sono costituite da ceramiche pure o vetrose².

In genere, i materiali ceramici utilizzati in applicazioni tecnologiche possono essere suddivisi in due categorie:

- a. Ceramici tradizionali, costituiti principalmente da argilla, silice e feldspato (materiali ceramici triassiali);
- b. Ceramici avanzati, formati principalmente da composti puri o quasi puri, quali l'ossido di alluminio, il carburo di silicio e il nitrato di silicio (allumina, nitrato di silicio, carburo di silicio, zirconia).

Per determinare il tipo di struttura cristallina che si formerà in quel determinato ceramico, si può sfruttare l'equazione di Pauling per determinare l'entità del legame ionico o covalente tra gli atomi del materiale.

$$\%_{\text{carattere ionico}} = \left(1 - e^{-0,25 \cdot (X_A - X_B)^2} \right) * 100$$

Dove X_A e X_B sono le elettronegatività degli elementi costituenti un composto AB.

I materiali ceramici presentano in genere bassi valori di resistenza a trazione, in dipendenza dei legami che si instaurano tra gli ioni del reticolo: tuttavia, presentano elevati valori di resistenza a compressione. La rottura meccanica di tali materiali avviene principalmente a causa di difetti presenti nella struttura dei materiali stessi. Le principali cause di innesco della rottura sono rappresentate in genere dalla presenza di cricche superficiali prodotte durante la finitura o di porosità e inclusioni, nonché dalla presenza di grani di elevate dimensioni prodotti durante la lavorazione. Si tratta, quindi, di materiali piuttosto fragili, motivo per cui è possibile apprezzare un ampio range di variabilità delle proprietà meccaniche.

I ceramici sono generalmente noti per la loro elevata resistenza all'usura e una scarsa tendenza a reagire con l'ambiente circostante: si classificano, quindi, come materiali tendenzialmente inerti. Gli ossidi ceramici principalmente utilizzati sono allumina e zirconia, singolarmente o in forma di materiale composito. Tali materiali presentano a grandi linee le stesse caratteristiche, tuttavia, la zirconia si

dimostra più tenace rispetto all'allumina, avendo inoltre maggiore resistenza a flessione, nonostante abbia un valore di modulo elastico inferiore.

Vetri

I vetri sono stati utilizzati dall'umanità per migliaia di anni in molteplici forme e applicazioni. La loro importanza complessiva nella vita quotidiana potrebbe non essere pienamente compresa a prima vista, a causa della vasta varietà di impieghi in settori che vanno dai materiali semplici e comuni (ad es., bottiglie, finestre, contenitori, lampadine, ecc.) ad applicazioni tecniche (ad es., tubi televisivi, schermi di computer, telescopi, prismi per spettrometri, attrezzature da laboratorio, fibre ottiche, ecc.) o per scopi artistici.

Vetri inerti

Nonostante sembri un solido a prima vista, la struttura amorfa e non cristallina rende il vetro un materiale in continua evoluzione che, nel tempo, tende a rilassarsi verso lo stato di liquido sottoraffreddato. Questa caratteristica lo distingue nettamente dai materiali cristallini, che hanno strutture atomiche ben definite e stabili. Il vetro, invece, rimane in uno stato non di equilibrio, conferendo una straordinaria flessibilità compositiva e una vasta gamma di applicazioni. Da un punto di vista termodinamico, può essere quindi definito come un liquido amorfo sottoraffreddato ad elevata viscosità.

Per avere un'idea più chiara delle caratteristiche principali dei vetri, si prenda in considerazione il grafico relativo all'entalpia in funzione della temperatura [Fig.1].

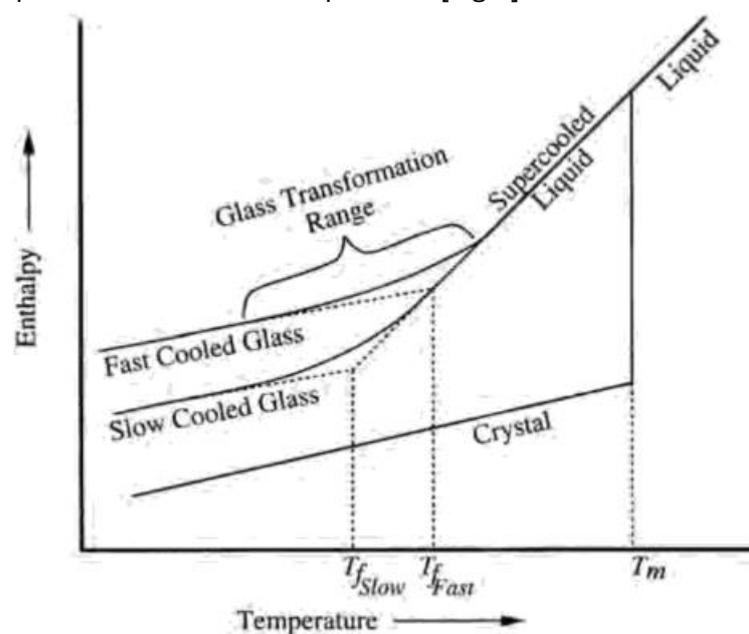


Figura 1. Effetto della temperatura sull'entalpia di un vetro fuso.³

Dal grafico in figura³ [Fig.1] si evince come, al diminuire della temperatura, la struttura del materiale subisca una serie di modifiche. In particolare, si distinguono quattro regioni:

- a. In equilibrio, i liquidi termodinamicamente stabili esistono soltanto al di sopra della temperatura di fusione (T_m) e non subiscono mai cristallizzazione.
- b. I liquidi super raffreddati (SCL) esistono tra la temperatura di fusione e la temperatura di transizione vetrosa (T_g). Si tratta di composti metastabili, affinché avvenga una cristallizzazione, deve essere superata una determinata barriera termodinamica e possono eventualmente cristallizzare dopo un determinato periodo di tempo.
- c. I vetri esistono al di sotto della T_g , sono termodinamicamente instabili e si rilassano spontaneamente nello stato di liquido super raffreddato a qualsiasi temperatura. Nel dettaglio, si pone una differenza sostanziale tra il vetro raffreddato lentamente e quello raffreddato velocemente che presenta una maggiore entalpia rispetto al primo.
- d. I cristalli sono invece veri e propri solidi con strutture atomiche ben organizzate a breve, medio e lungo raggio, termodinamicamente stabili al di sotto della temperatura di fusione.

Per quanto riguarda la struttura del vetro, una delle prime ipotesi fu avanzata da Zacharisen⁴, secondo cui gli atomi in un cristallo e in un vetro sono legati insieme dallo stesso tipo di interazioni e vibrano intorno alla loro posizione di equilibrio (*Random network theory*). Tuttavia, i vetri non possiedono la periodicità e la struttura simmetrica tipica dei cristalli. A causa della mancanza di simmetria, la cella unitaria del vetro ha dimensione infinita. Analizzando la struttura della silice vitrea, è stato osservato come la rete vetrosa sia costituita da tetraedri di ossigeno che circondano atomi di silicio [Fig. 2]. I tetraedri sono collegati tra loro condividendo i vertici, in modo che ogni atomo di ossigeno sia legato a due atomi di silicio.

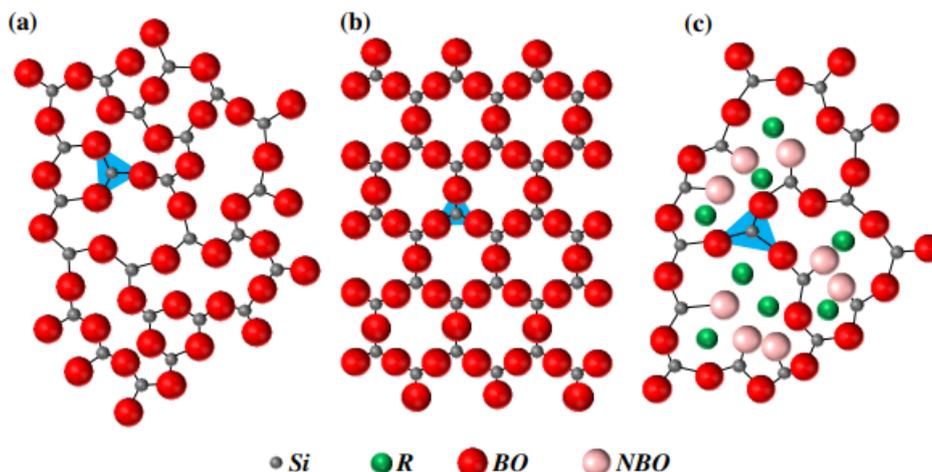


Figura 2. Rappresentazione bidimensionale della struttura reticolare di (a) silice vetrosa e (b) silice cristallina; (c) silicato vetroso. (R rappresenta un generico catione modificatore della rete; mentre BO e NBO indicano rispettivamente l'ossigeno pontante e non-pontante⁵).

Sulla base di quanto visto, sono poi state formulate le seguenti regole generali valide per gli ossidi vetrosi:

- a. Ogni atomo di ossigeno è legato a non più di due cationi.

- b. Il numero di coordinazione dell'ossigeno del catione del network è basso.
- c. I tetraedri o i triangoli di ossigeno condividono solo i vertici, e non gli spigoli o le facce.
- d. Almeno tre vertici di ciascun poliedro di ossigeno devono essere condivisi per formare una rete tridimensionale (3D).
- e. Il campione contiene un'alta percentuale di cationi, che sono circondati da tetraedri di ossigeno o da triangoli di ossigeno.

Tuttavia, queste regole non spiegano la formazione dei vetri nei sistemi non ossidici, quindi non dovrebbero essere usate come dogma, bensì come linea guida generica per condurre l'analisi strutturale dei vetri.

Per quanto riguarda i costituenti del vetro, questi vengono suddivisi in base alla natura chimica o in base alla funzione della categoria dello specifico materiale. Ai *Network Formers* (silice, anidride borica, anidride fosforica) vengono aggiunti degli ossidi (*Modifier Formers*) che siano in grado di rompere il reticolo, modificando quindi la struttura del vetro.

Categoria	Composti o classe chimica	Funzione
<i>Fondenti</i>	K_2O, Na_2O	Coadiuvano il processo di fusione, abbassano il punto di fusione.
<i>Stabilizzanti</i>	CaO, BaO, MgO, ZnO	Rendono la struttura del vetro meno alterabile e più resistente all'attacco dei liquidi.
<i>Affinanti</i>	As_2O_3 , nitrati alcalini e d'ammonio	Permettono l'espulsione dal fuso di bolle gassose dovute alla decomposizione dei carbonati aggiunti.
<i>Coloranti</i>	Ossidi di ferro, rame, cromo e cobalto	Alterazione cromatica
<i>Decoloranti</i>	MnO_2	Neutralizzazione cromatica
<i>Opacizzanti</i>	Fosfati di sodio/calcio, cloruri di sodio/calcio, ossido di stagno, talco	Produzione di vetro opalino

Tabella 1. Modificatori di reticolo

In base alle componenti aggiunte, si distinguono varie tipologie di vetri che avranno diverse proprietà finali pur partendo da identiche proprietà di base.

Vetroceramici

I vetroceramici sono stati scoperti verso la metà del XX secolo e derivano dalla cristallizzazione controllata di vetri di partenza, creando un materiale che contiene una o più fasi cristalline immerse in una matrice vetrosa residua, a seconda della composizione del vetro e del trattamento termico applicato. Durante il processo di cristallizzazione, si formano strutture cristalline, spesso metastabili, che possono essere trasformate in fasi cristalline stabili con ulteriori trattamenti termici. La composizione del vetro di partenza e la nucleazione controllata consentono di ottenere vetroceramici con microstrutture speciali che sarebbero impossibili da realizzare con altri materiali. I meccanismi di cristallizzazione applicata possono essere compresi applicando un approccio termodinamico. La nucleazione può essere omogenea, avvenendo in maniera random nella matrice del vetro, oppure

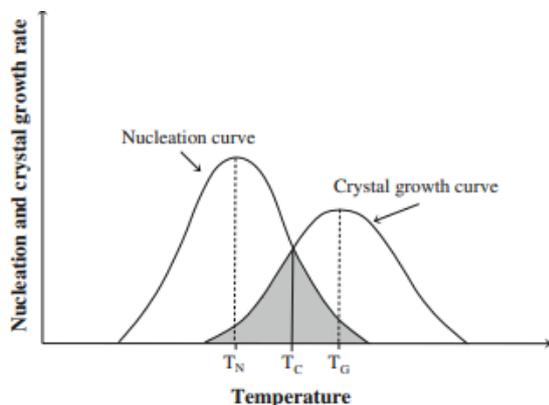


Figura 3. Schema della dipendenza del tasso di nucleazione e della velocità di crescita cristallina dalla temperatura⁸⁶.

eterogenea, verificandosi principalmente sulla superficie (interfaccia aria-liquido) o all'interfaccia con altre impurità. Il tasso di crescita dei cristalli viene espresso come differenza tra il numero di atomi che raggiungono il piano cristallino dal liquido super raffreddato e il numero di atomi che ritornano al liquido dal piano cristallino. La dipendenza della velocità di nucleazione e della velocità di crescita cristallina dalla temperatura è mostrata schematicamente in figura [Fig.3]. La dipendenza effettiva della velocità di nucleazione dalla temperatura varia da un vetro all'altro, ma la velocità massima di nucleazione si verifica a una temperatura inferiore rispetto alla velocità massima di crescita cristallina, ovvero più vicina alla temperatura di transizione vetrosa. Se si desidera promuovere attivamente la cristallizzazione, la vetroceramica viene preparata tramite trattamento termico nell'intervallo di temperatura in cui la nucleazione e la crescita si sovrappongono.

In ambito biomedico, il vetro riveste un ruolo fondamentale grazie alla sua capacità di essere modellato per rispondere a specifiche necessità. I vetri bioattivi, in particolare, hanno dimostrato un enorme potenziale terapeutico poiché possono rilasciare ioni in modo controllato, stimolando processi biologici come l'osteoaduzione o tramite azioni antimicrobiche. Queste proprietà rendono il vetro un materiale essenziale per lo sviluppo di soluzioni innovative in medicina, come rivestimenti per impianti ossei, dispositivi ottici e supporti per la rigenerazione dei tessuti⁵.

Biomateriali

Tra il 1960 e il 1970, è stata introdotta una prima generazione di materiali il cui fine fosse l'utilizzo prolungato all'interno del corpo umano. L'obiettivo di questi primi biomateriali era quello di raggiungere una condizione favorevole, in modo tale che le proprietà fisiche del materiale corrispondessero a quelle del tessuto rimpiazzato, evitando una eventuale risposta tossica nell'ospite ⁶.

Nel 1982, il **National Institutes of Health Consensus Development Conference** ha definito un biomateriale come *“qualsiasi sostanza (diversa da un farmaco) o combinazione di sostanze, di origine sintetica o naturale, che può essere utilizzata per qualsiasi periodo di tempo, da sola o come parte di un sistema che tratta, supporta o sostituisce qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo”*. ⁷

I biomateriali sono quindi dispositivi o materiali utilizzati nel trattamento di disordini, fisiologici, anatomici o biochimici che non possono essere corretti tramite altre terapie o procedure.

Sulla base dello sviluppo della tecnologia e della scienza medica, si sono osservate varie generazioni di biomateriali:

- Materiali di **prima generazione** (materiali **inerti**), con l'obiettivo di scaturire la minima risposta possibile una volta posti a contatto con l'organismo;
- Materiali di **seconda generazione** (materiali **bioattivi**), dove si cerca una reattività positiva o interazione controllata con l'ambiente fisiologico.
- Materiali di **terza generazione** (materiali **biomimetici**), con l'obiettivo di rigenerare la funzionalità del tessuto, cercando di stimolare la risposta delle cellule fino al livello molecolare.

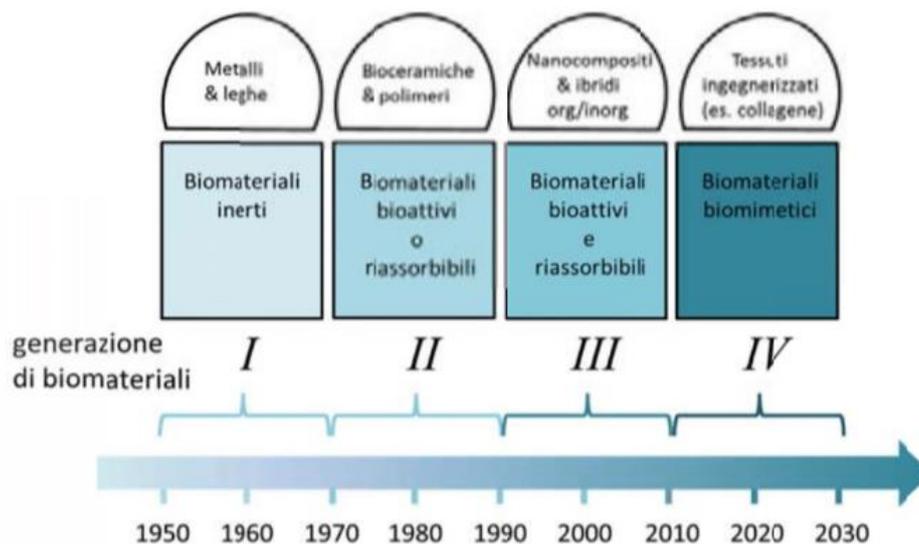


Figura 4. Linea temporale dei materiali biocompatibili⁸

I materiali possono essere inoltre classificati sulla base di differenti criteri⁸. In base alla composizione chimica, questi si suddividono in [Fig.4]:

-
- a. **Metallici**, utilizzati in genere per impianti sottoposti a carichi ciclici, quali protesi di anca o di ginocchio, o anche *stent* vascolari.
 - b. **Polimerici**, sia naturali che artificiali: rappresentano la classe più utilizzata in ambito biomedicale in quanto sono facilmente prodotti e modificati, oltre alla possibilità di essere biodegradabili. Questi possono essere utilizzati per dispositivi cardiovascolari volti al rimpiazzo o al supporto di diversi tessuti molli (quali le valvole cardiache o i *grafts* vascolari), ma possono anche essere utilizzati nei sistemi di *drug delivery* o come *scaffolds* per applicazioni nell'ingegneria tissutale.
 - c. **Ceramici e vetrosi**, solitamente utilizzati come componenti di impianti d'anca, dentali, dell'orecchio medio e valvole cardiache. Sono dei materiali usati con meno frequenza rispetto a quelli più tradizionali quali metalli o polimeri. Alcuni tra i ceramici più utilizzati sono l'allumina, il carbone pirolitico e la zirconia, di cui si discuterà successivamente. Il vantaggio principale di questa categoria è il fatto di essere piuttosto duri e chimicamente inerti.
 - d. **Compositi**, ovvero materiali solidi che possono contenere due o più distinti materiali o fasi costituenti. Si tratta in genere di materiali dove proprietà, quali il modulo elastico, sono significativamente alterate se si comparano con le proprietà del materiale omogeneo di partenza.

Interazione tra materiali e sistemi biologici

Per capire se un determinato materiale è utilizzabile a livello biologico, bisogna valutarne l'interazione con tessuti/sistemi biologici e le risposte che si hanno da parte dell'organismo. L'interazione fra materiali estranei e sistemi biologici avviene attraverso interazioni microscopiche tra la superficie del solido e le cellule viventi. La risposta biologica si può analizzare da due punti di vista, quello della risposta del materiale, che entra in contatto con fluidi corporei e tessuti viventi, e quello della risposta dell'organismo quando ospita il materiale. In base al tipo di interazione, sono state individuate le seguenti classi di materiali:

- a. Materiali **bioinerti**: non reagiscono chimicamente con il tessuto con cui sono posti a contatto. Tuttavia, la loro presenza può scatenare la risposta da corpo estraneo che può portare alla formazione di una capsula fibrotica attorno all'impianto. Esempi di questi materiali includono l'acciaio inossidabile, il titanio, l'allumina, la zirconia parzialmente stabilizzata e il polietilene ad elevato peso molecolare.
- b. Materiali **bioattivi**: instaurano un legame funzionale con i tessuti circostanti. Esempi principali di questi materiali sono l'idrossiapatite sintetica, i vetroceramici e i biovetri.
- c. Materiali **bioassorbibili**: iniziano a degradarsi dopo essere stati posti all'interno dell'organismo, essendo gradualmente rimpiazzati dal tessuto sano.
- d. Materiali **biomimetici**: scambiano attivamente segnali di tipo biologico o chimico-fisico con l'organismo.

Biocompatibilità

Si introduce in questo ambito il concetto di biocompatibilità, ovvero la proprietà di un materiale di essere biologicamente compatibile, in quanto non produce nell'organismo alcuna risposta di tipo tossico, dannoso o immunologico. Per riconoscere la proprietà di biocompatibilità di un materiale, bisogna essere a conoscenza della risposta immunitaria che esso genera una volta a contatto con l'organismo.

Tradizionalmente, il successo di un biomateriale era definito dalla sua capacità di ridurre al minimo le risposte infiammatorie. Tuttavia, si sta rivalutando l'idea che permettere una risposta naturale del corpo possa migliorare l'integrazione e la funzione del biomateriale. La sincronia tra infiammazione e risoluzione è cruciale per la guarigione, e i biomateriali moderni sono progettati per ottimizzare le loro interazioni chimiche con il sistema immunitario, migliorando il processo di guarigione.

La risposta dell'organismo ai biomateriali deriva principalmente da segnali e stimoli biochimici. Una volta che un qualsiasi materiale, che sia anche inerte o non tossico, viene inserito all'interno del corpo umano, questo verrà identificato come un corpo estraneo. L'organismo metterà quindi in atto una serie di meccanismi di difesa per espellere tale agente esterno. Sono in totale cinque gli step essenziali che

definiscono il meccanismo di difesa messo in atto in seguito alla reazione da corpo estraneo:

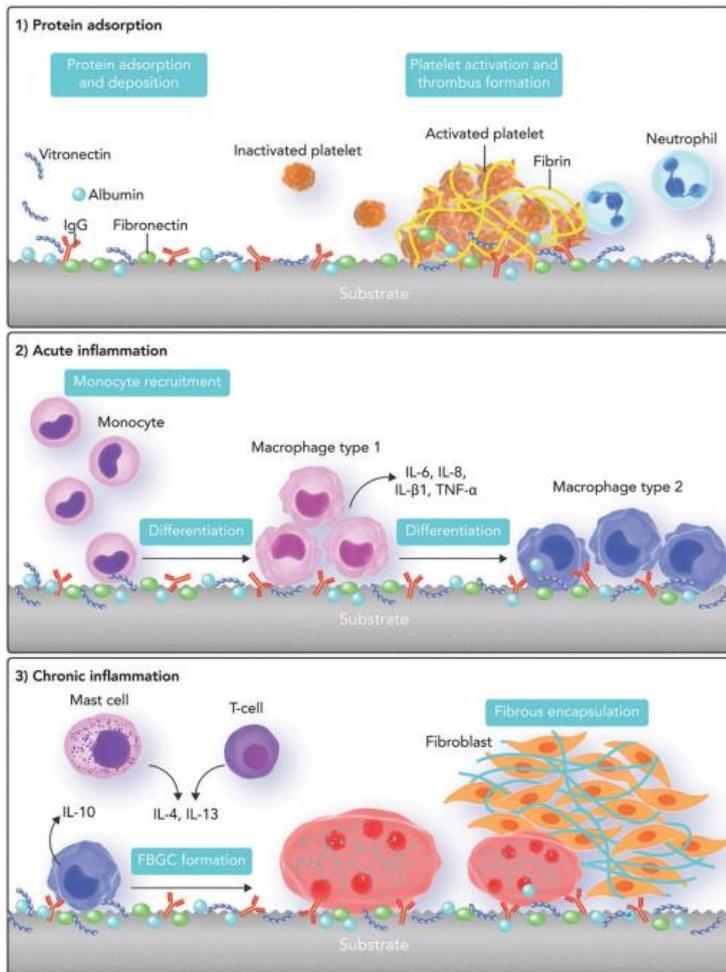


Figura 5. Meccanismo di infiammazione da corpo estraneo⁹

1. Interazione sangue-materiale (assorbimento proteico);
2. Infiammazione acuta;
3. Infiammazione cronica;
4. Formazione di cellule giganti da corpo estraneo;
5. Formazione della capsula fibrotica.⁹

Quando un materiale estraneo entra in contatto con il sangue, l'adsorbimento delle proteine avviene entro pochi secondi. Questo processo condiziona le reazioni successive, che includono la coagulazione plasmatica, l'adesione e l'attivazione delle piastrine, e le interazioni con i leucociti, portando all'infiammazione e alla deplezione cellulare transitoria. Albumina, fibrinogeno e immunoglobulina rappresentano il 50% delle proteine del sangue. Mentre l'albumina è nota per essere piuttosto inerte rispetto all'adesione e all'aggregazione piastrinica, l'adsorbimento di fibrinogeno porta alla trombosi indotta dal materiale. Altre proteine, come fibronectina, vitronectina e il fattore di von Willebrand (vWF), quando pre-adsorbite sui materiali, hanno dimostrato di indurre l'adesione e l'aggregazione piastrinica. L'effetto Vroman afferma che l'adsorbimento proteico è un processo dinamico, in cui proteine abbondanti vengono adsorbite entro pochi secondi e successivamente

sostituite da proteine meno abbondanti ma con maggiore affinità superficiale. Tuttavia, il cambiamento di conformazione delle proteine adsorbite può influenzare anche l'adesione piastrinica.

Le proprietà superficiali dei materiali (chimica della superficie e gruppi funzionali, energia libera superficiale e bagnabilità, topografia e rugosità della superficie) hanno anche dimostrato di giocare un ruolo importante nel determinare il destino dei biomateriali. Tuttavia, una volta che uno strato proteico si forma all'interfaccia del materiale, l'effetto delle proprietà superficiali diventa minimo.

Dopo l'adsorbimento delle proteine del sangue, si verifica la risposta naturale del corpo al danno tissutale dovuto all'impianto. Durante questa fase, i neutrofili e i monociti vengono reclutati nel sito. È stato inoltre riportato che il fibrinogeno adsorbito sul materiale agisce come un innesco per il rilascio di istamina da parte dei mastociti, seguito dal reclutamento di fagociti sulla superficie dell'impianto. Ciò attiva di conseguenza la risposta infiammatoria acuta. Il trombo all'interfaccia tra tessuto e materiale può anche facilitare le risposte infiammatorie tramite il reclutamento e l'attivazione dei macrofagi e di altre cellule immunitarie. Questa fase è caratterizzata anche da un'ondata di leucociti polimorfonucleati. Qualunque sia la causa dell'infiammazione acuta, a seconda dell'entità del danno, questa si ridurrà entro una settimana in assenza di infezione, portando al ripristino dell'integrità tissutale.

Se il materiale impiantato continua a indurre stimoli infiammatori, può portare a un'infiammazione cronica. Rispetto all'infiammazione acuta, questa è meno uniforme dal punto di vista istologico, caratterizzata dalla presenza di monociti, macrofagi e linfociti, nonché da un aumento dei vasi sanguigni e del tessuto connettivo.

La comparsa di cellule giganti multinucleate nel sito dell'impianto è indicativa di reazioni da corpo estraneo verso il materiale dell'impianto. Le cellule giganti da corpo estraneo si formano quando i monociti e i macrofagi si fondono per inglobare il materiale dell'impianto o i detriti di dimensioni comprese tra 50 e 100 μm . Le cellule giganti da corpo estraneo rilasciano segnali per attrarre i fibroblasti al sito dell'impianto.

I fibroblasti depositano collagene, portando all'isolamento dell'impianto dal resto del corpo. L'impianto viene inglobato all'interno di una capsula fibrosa. Anche se si verifica la formazione di quest'ultima, l'impianto sarà considerato biocompatibile, a condizione che non ci siano effetti negativi sul suo funzionamento. L'adsorbimento delle proteine superficiali può essere controllato regolando la bagnabilità della superficie, la polarità, la carica e i componenti dei biomateriali. Se il materiale evoca una risposta immunitaria, portando alla produzione di vari agenti infiammatori, il corpo potrebbe infine rigettare il materiale. Utilizzando strategie adeguate, le superfici dei biomateriali possono essere modificate per ridurre al minimo la risposta immunitaria del corpo.¹⁰

Ceramici bioinerti

I materiali ceramici possono essere utilizzati sia in ambito ortopedico (teste femorali, componenti di artroprotesi) che per impianti dentali. Aspetto importante dei ceramici riguarda il fatto che, a livello articolare, si lubrificano meglio rispetto ai materiali metallici: ciò avviene perché essendo costituite da ioni, i ceramici possiedono cariche nette superficiali più elevate che permettono di attrarre le molecole d'acqua presenti nel fluido sinoviale in maniera ordinata, formando uno strato superficiale idratato che riduce l'usura.

Zirconia

Negli ultimi dieci anni, l'uso delle ceramiche a base di zirconia (ZrO_2) per impianti e corone dentali in odontoiatria è aumentato significativamente, grazie alle superiori proprietà meccaniche dello ZrO_2 , tra cui l'elevata resistenza, la biocompatibilità, nonché la sua elevatissima resistenza all'usura e all'attrito.

In base alla temperatura, la zirconia può assumere differenti strutture cristalline, ciascuna stabile per un certo range di temperatura. La zirconia pura è monoclinica in condizioni ambientali fino a $1170^\circ C$, aumentando ancora la temperatura, si avrà la formazione della struttura cristallina tetragonale, stabile fino a $2370^\circ C$ circa e, infine, avrà struttura cristallina cubica per temperature superiori ai $2370^\circ C$.

La trasformazione da tetragonale a monoclinica è martensitica, immediata e comporta un aumento del volume del 9% che non può essere compensata in nessun modo se non con la formazione di fessure, rotture o fratture del componente, motivo per cui è impossibile sinterizzare la zirconia pura. Al fine di mantenere una struttura cristallina simmetrica anche a temperatura ambiente, si tenta di stabilizzare la zirconia mediante l'aggiunta di ossidi refrattari stabilizzanti che si inseriscono all'interno della cella elementare e permettono di mantenere la struttura tetragonale (CaO , MgO , Y_2O_3 e CeO_2). Nel 1975, il fisico britannico Ron Garvie scoprì che la struttura tetragonale di ZrO_2 poteva essere stabilizzata con il drogaggio di circa il 5,5% di ossido di ittrio, ottenendo così un materiale ceramico estremamente duro e resistente, evidenziando un aumento della tenacità in seguito all'attivazione di due differenti meccanismi:

- a. La zirconia in fase tetragonale metastabile si trasforma in monoclinica quando interviene una sollecitazione meccanica. Quanto detto potrebbe capitare, ad esempio, in prossimità dell'apice di una cricca dove si incontrano alcuni grani di fase tetragonale metastabile che si trasformano in fase monoclinica. In questo caso, l'espansione di volume dei grani che vanno incontro a trasformazione può trovare sfogo nella chiusura dell'apice della cricca quindi, la trasformazione tende a bloccare la propagazione della cricca.

b. La zirconia, in prossimità dell'apice della cricca, va incontro a frammentazione, dando vita a delle microcricche più piccole che tenderanno a propagarsi con un'energia più bassa e per un tratto più breve (*microcracking*).¹¹

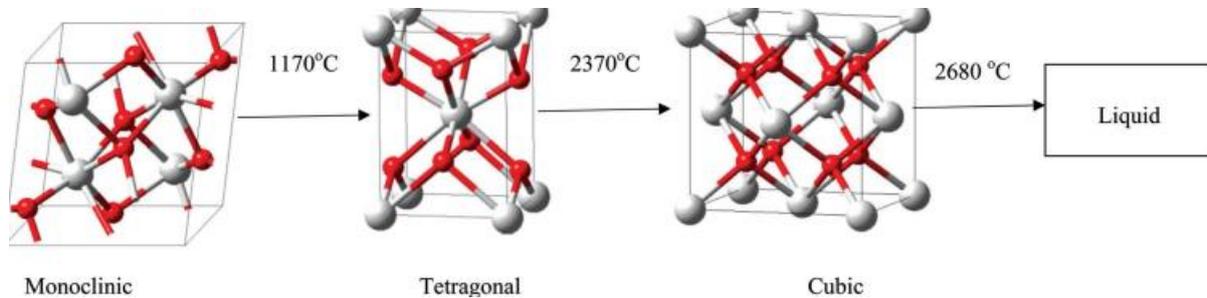


Figura 6. Fasi cristalline della zirconia: monoclinica, tetragonale e cubica¹¹.

Uno svantaggio dei ceramici a base di zirconia è rappresentato dal fatto che questi possono essere compromessi quando esposti a calore e umidità considerevoli. Negli anni '60, la zirconia è stata studiata come un potenziale biomateriale, noto come policristalli di zirconia tetragonale (TZP). Si scoprì che le sue proprietà erano ideali per la costruzione di protesi dell'anca e per restauri dentali. Grazie alla sua elevatissima resistenza, la zirconia è stata soprannominata "acciaio ceramico" e, negli ultimi due decenni, ha fatto il suo debutto in campo odontoiatrico, inizialmente per la fabbricazione di corone resistenti e, più recentemente, come materiale per impianti dentali. Recenti studi hanno infatti rivelato come gli impianti zirconia risultino comparabili agli impianti in titanio in termini di osteointegrazione e biocompatibilità¹². La zirconia possiede proprietà meccaniche molto simili a quelle dell'acciaio inossidabile. La sua resistenza alla trazione si colloca nel range di 900–1200 MPa e la sua resistenza alla compressione è di circa 2000 MPa. È stato dimostrato che un ponte in zirconia può mantenere la sua forza anche dopo un periodo di 50 anni. Inoltre, studi hanno anche riportato che lo zirconio è estremamente biocompatibile e non causa sintomi allergici negli esseri umani durante i processi di impianto, motivo per cui si presta come una valida alternativa agli impianti dentali in titanio.

Di base, le proprietà meccaniche e l'osteointegrazione del titanio si rivelano essere superiori alla zirconia in assenza di trattamento superficiale mentre, quando sulla superficie della zirconia vengono implementate tecniche di modifica superficiale (quali *etching* acido, CVD o PVD), le proprietà di osteointegrazione e adesione cellulare sembrano essere simili a quelle del titanio¹³. Infine, alcuni studi hanno messo in luce come negli impianti in zirconia venga osservato un minor tasso di adesione batterica, motivo per cui si propone come un materiale perfetto per la realizzazione di abutement.¹⁴

Bioattività

Il concetto di bioattività deriva da quello di biocompatibilità. Un materiale si definisce bioattivo se è in grado di formare un tessuto sano sulla superficie dell'impianto stesso e di legarsi chimicamente al tessuto, creando un'interfaccia tra quest'ultimo e il materiale (L.L. Hench et al.). Tale categoria inizia a svilupparsi durante lo studio di materiali per sostituzioni ossee. I materiali bioattivi, infatti, generano diverse reazioni biofisiche e biochimiche all'interfaccia tra biomateriale e tessuto ospite, con la formazione di un legame chimico interfacciale meccanicamente forte come risultato finale (fissazione bioattiva). Questo fenomeno è dovuto in gran parte alla compatibilità biochimica e biomeccanica del materiale bioattivo con il tessuto target: il materiale bioattivo crea un ambiente favorevole alla crescita ossea e la sua interfaccia mineralizzata (uno strato di apatite carbonata idrossilata biologicamente attiva, HCA, formato sull'impianto) rappresenta la connessione tra materiale vivente e non vivente.¹⁵

I materiali bioattivi possono essere suddivisi in quattro categorie:

1. Materiali ceramici a base di fosfati di calcio (apatiti);
2. Vetri bioattivi;
3. Vetroceramici bioattivi;
4. Compositi bioattivi.

A seconda delle modalità di ancoraggio con l'osso, si possono distinguere diverse tipologie di materiali.

I bioceramici sono stati classificati nel 1991 da Larry L. Hench e raggruppati nel seguente modo:

- a. Ancoraggio morfologico: riferito a quei materiali incapaci di guidare la crescita ossea in modo attivo; al più, i tessuti possono crescere se riescono ad agganciarsi a qualche irregolarità superficiale, indotta effettuando dei trattamenti superficiali. Questi materiali inerti, se caricati in compressione con un ancoraggio meccanico molto forte possono riuscire ad integrarsi dopo aver indotto la risposta da corpo estraneo con la conseguente formazione della capsula fibrosa.
- b. Ancoraggio biologico: tipico dei materiali tendenzialmente inerti, realizzati in forma porosa in modo tale da guidare in maniera efficace la crescita dell'osso che avverrà all'interno dei pori (con dimensione variabile tra decine e centinaia di micron);
- c. Ancoraggio bioattivo: tipico di materiali bioattivi, tra cui vetri, vetroceramici o idrossiapatite. In questo caso, sarà la superficie stessa del materiale a stimolare la crescita ossea a prescindere dalla presenza o meno di porosità, poiché avviene un legame chimico tra osso e biomateriale.
- d. Biorisorbimento: si riferisce ai materiali biodegradabili, progettati per aderire inizialmente all'osso e poi degradare gradualmente per sostituirsi al tessuto in via di neoformazione.

Misura della bioattività

Come detto precedentemente, un materiale bioattivo crea un ambiente compatibile con l'osteogenesi (formazione di nuovo osso), permettendo la mineralizzazione dell'interfaccia come legante naturale tra materia vivente e non. Questo concetto è stato recentemente ampliato per includere un gran numero di materiali bioattivi con una vasta gamma di velocità di legame e di spessore dello strato di legame interfacciale. Tra questi ritroviamo vetri bioattivi come il Bioglass®, vetroceramici bioattivi (tra cui Ceravital®, vetroceramici A/W e vetroceramici lavorabili), ceramici densi di fosfato di calcio come l'idrossiapatite sintetica (HA), compositi bioattivi (miscele PE-HA) e una serie di materiali utilizzati come *coatings* bioattivi. Per ciascun materiale bioattivo si hanno meccanismi di legame, dipendenza temporale dal legame, resistenza del legame e spessore della zona di legame differenti.

La velocità di formazione del legame interfacciale può essere un buon indicatore del livello di bioattività, come si denota dal grafico sottostante [Fig.7], dove sono rappresentati bioattività relativa e dipendenza temporale della formazione di legame osseo interfacciali per differenti bioceramici.

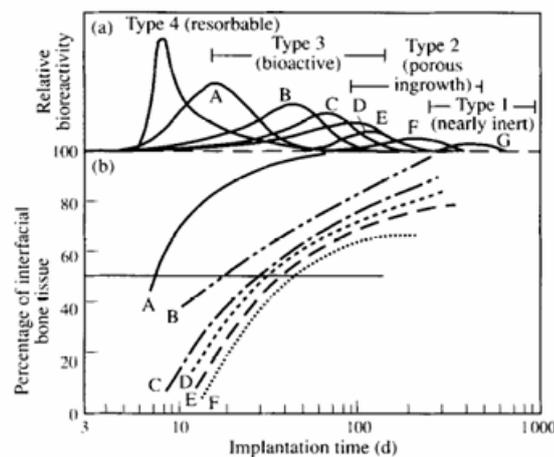


Figura 7. Spettro di bioattività per vari impianti bioceramici: (a) tasso relativo di bioattività e (b) dipendenza temporale della formazione del legame osseo all'interfaccia dell'impianto. [(A) 45S5 Bioglass, (B) Minal3 Ceravital, (C) 55S4.3 Bioglass, (D) A/W glass-ceramic, (E) HA, (F) KGy213 Ceravital¹⁶.

Il livello di bioattività di uno specifico materiale può essere correlato al tempo necessario affinché più del 50% dell'interfaccia sia legata. A questo proposito, Hench introdusse un parametro noto come indice di bioattività, calcolato nel seguente modo:

$$I_b = \frac{100}{t_{0.5bb}},$$

dove il denominatore rappresenta il tempo necessario affinché il 50% della superficie dell'impianto sia legata ai tessuti. Sulla base di questa grandezza, si possono confrontare i materiali a contatto con l'osso.

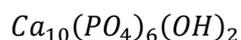
È stata riscontrata una grande differenza nei tassi di formazione di legame tra osso e impianti che potrebbe essere indicativa dei differenti fattori biochimici che si verificano all'interfaccia impianto – tessuto.

Nel 1994, venne proposta una nuova ipotesi inerente alla classificazione dei materiali bioattivi in due classi:

- a. Classe A, materiali osteoinduttivi. L'osteoiduzione è stata definita come *“Il processo tramite cui una superficie bioattiva è colonizzata da cellule staminali osteogeniche come risultato dell'intervento chirurgico”*. Il materiale in questione, quindi, provoca una risposta all'interfaccia sia intra che extracellulare, motivo per cui i vetri bioattivi appartenenti a questa classe di materiali possono legarsi sia all'osso che ai tessuti molli.
- b. Classe B, materiali osteoconduttivi. Un impianto osteoconduttivo fornisce semplicemente una interfaccia biocompatibile su cui possono migrare le cellule dell'osso. L'osteconduzione si verifica quindi quando il materiale provoca una risposta soltanto a livello extracellulare. Un esempio di materiale osteoconduttivo è l'idrossiapatite (HAp).¹⁶

Ceramici bioattivi (osteoconduttivi) – Idrossiapatite

Le apatiti costituiscono una classe di materiali molto vasta, tra cui spiccano le apatiti fosfocalciche, in quanto ampiamente utilizzate nel campo della sostituzione ossea. Tra queste, si evidenzia l'idrossiapatite: un sale doppio costituito dalla combinazione di due sali, fosfato tricalcico e idrossido di calcio.



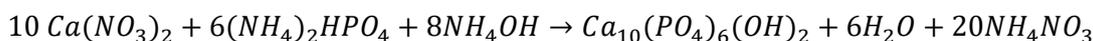
Questa si propone come materiale biocompatibile altamente promettente per applicazioni biomediche, grazie alla sua capacità osteoconduttiva, alla resistenza al bioassorbimento e alla capacità di sviluppare un forte legame con i tessuti ossei. Esistono tre principali strategie di sintesi del suddetto materiale:

- Sintesi per via umida;
- Sintesi tramite tra reazioni allo stato solido;
- Sintesi tramite trattamenti idrotermali.

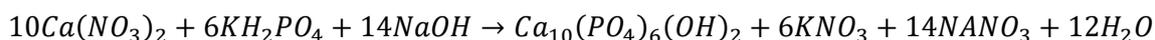
Sintesi per via umida

Tra le pratiche di sintesi per via umida, alcune delle più adoperate sono:

- Precipitazioni da soluzioni acquose, come reazioni tra due sali:



- Precipitazione acidimetrica, in cui si ha uno scambio tra sali e viene fatto reagire il nitrato di calcio, in ambiente basico grazie alla presenza di NaOH.



- Reazioni acido base, ad esempio idrossido di calcio e acido fosforico che portano alla formazione di sale doppio e acqua.



- Reazioni di tipo sol-gel, in cui si utilizzano precursori che permettono la trasformazione della soluzione di partenza colloidale (miscela di sostanze solubili quali sali inorganici o composti metallorganici) ad un gel solido che a sua volta può essere disidratato e trattato per ottenere polveri molto fini di HA.

Reazioni allo stato solido

I processi a secco per la preparazione dell'idrossiapatite implicano la diffusione allo stato solido durante la calcinazione di miscele contenenti quantità appropriate di ioni Calcio e Fosfato. Ad esempio, l'idrossiapatite può essere sintetizzata a partire da Sali alcalinoterrosi (Ca, Sr o Ba) e H_3PO_4 .

L'HA può anche essere preparata calcinando miscele di $Ca_3(PO_4)_2$ e $CaCO_3$, CaP_2O_7 e $CaCO_3$, oppure $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ e CaO tra 900 e 1300°C in presenza di vapore acqueo.

I processi a secco assicurano la formazione di HA stechiometrica (rapporto Ca: P=1.67), ma richiedono energia (alte temperature) e tempi notevoli. Inoltre, i prodotti di tali processi tipicamente mancano di omogeneità.

Trattamenti idrotermali

Si tratta principalmente di trattamenti che prevedono l'applicazione a soluzioni acquose di elevate pressioni per innalzare la temperatura al di sopra del punto di ebollizione, in modo tale da facilitare la precipitazione di cristalli di maggior purezza rispetto a quelli ottenibili con i metodi tradizionali. Si lavora in autoclave, dove l'elevata temperatura in ambiente chiuso favorisce la formazione di vapore del solvente che permette l'innalzamento della pressione. In questo modo, è possibile ottenere cristalli di diverse grandezze e morfologie.

Agendo poi su parametri quali pH e temperatura, si possono ottenere particelle di geometria e morfologia diversa, con dimensioni differenti.

HAp densa e porosa

Partendo dalle polveri ottenute con i metodi sopracitati, è possibile realizzare dei blocchi di HA densa o porosa.¹⁷

Generalmente, per produrre impianti in grado di sopportare carichi meccanici piuttosto elevati, si predilige l'utilizzo di ceramiche sinterizzate densamente, poiché superano in resistenza i corrispettivi porosi. Secondo la formula di Hall-Petch¹⁸, la resistenza meccanica aumenta al diminuire della dimensione del grano, motivo per cui è preferibile utilizzare ceramiche costituite da grani fini.

Tuttavia, per numerose applicazioni, potrebbe essere vantaggioso optare per ceramiche contenenti pori interconnessi. Queste possono essere utilizzate come sostituti dell'innesto osseo. Per garantire l'afflusso di sangue alle superfici di contatto, la crescita ossea e il fissaggio, i pori interconnessi devono avere diametro di almeno 100-135 μm . Possono essere necessari pori più piccoli al fine di favorire l'adsorbimento delle proteine e l'adesione delle cellule osteogeniche. La morfologia dei pori è quindi fondamentale per il processo di osteointegrazione. Attraverso il burnout dei porogeni, è possibile

produrre pori cilindrici con diametro fino a 500 μm e lunghezza superiore a 5 mm. Le ceramiche porose possono anche essere prodotte a temperatura fisiologica senza sinterizzazione, sebbene tali materiali abbiano una resistenza piuttosto bassa¹⁷.

Per quanto concerne il meccanismo di osteoconduttività dell'idrossiapatite, è possibile affermare che questo è costituito da due fasi:

1. Dissoluzione del fosfato di calcio a causa dell'ambiente reso acido dal metabolismo cellulare, motivo per cui l'idrossiapatite viene solubilizzata e rilascia nell'ambiente circostante ioni necessari agli osteoblasti per produrre nuovo osso;
2. Formazione in soluzione di fosfati misti che in seguito idrolizzano in presenza di ioni CO_3^{2-} per dare idrossicarbonapatite (HCA).

In un ambiente acido come quello dei fluidi biologici, l'HAp può essere quindi solubilizzata, rilasciando ioni calcio e fosfato utili agli osteoblasti per produrre nuovo osso.

L'idrossiapatite è stata utilizzata come mezzo di fissazione per gli impianti ortopedici e dentali fin dagli anni '80, come si denota dalla timeline sottostante [Fig.8].¹⁹

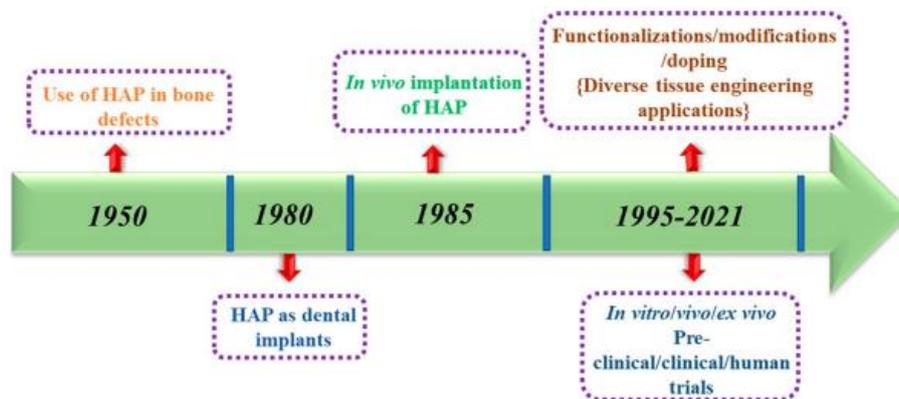


Figura 8. Evoluzione storica dell'HAp nell'ingegneria tissutale¹⁹

L'HA come rivestimento superficiale, tenta di migliorare la fissazione ossea all'impianto, aumentando così la durata degli impianti metallici. Un'attività osteoblastica più elevata e livelli aumentati di collagene in vitro sono stati osservati nelle colture di cellule proliferate su titanio rivestito di HAp; in vivo, il rivestimento di HAp può quindi portare ad un'area di contatto osso-impianto maggiore. Il miglioramento della crescita del tessuto mineralizzato ha migliorato la fissazione biologica, la biocompatibilità e la bioattività degli impianti dentali.

La deposizione di HAp può essere ottenuta tramite numerose tecniche, tra cui plasma spraying, sputter coating, deposizione laser pulsata, *dip-coating*, sol-gel, deposizione elettroforetica, deposizione elettrochimica e rivestimenti biomimetici, ciascuna con vantaggi e svantaggi. Alcuni studi hanno suggerito che sia le fasi amorfe che quelle cristalline nei rivestimenti siano ugualmente desiderabili al fine di promuovere un'interfaccia più stabile con l'ambiente biologico. Rivestimenti di HAp più sottili,

dell'ordine dei nanometri, hanno invece rivelato una risposta cellulare maggiore rispetto ai rivestimenti più spessi. Rivestimenti biomimetici di nanoapatite su scaffold di titanio poroso hanno invece mostrato una coltura osteoblastica umana migliorata. Recentemente, scaffold compositi biomimetici HAp-polimero sono stati ampiamente esplorati per la rigenerazione ossea.²⁰

La fabbricazione di innesti ossei bioartificiali con proprietà strutturali, meccaniche e biologiche simili alla matrice ossea naturale rappresenta una grande sfida nell'ingegneria del tessuto osseo. Gli scaffold sintetizzati per queste applicazioni devono presentare alcune importanti proprietà, tra cui porosità controllata, elevate proprietà meccaniche ed affinità cellulare, citotossicità trascurabile e emocompatibilità [Fig. 9].¹⁹

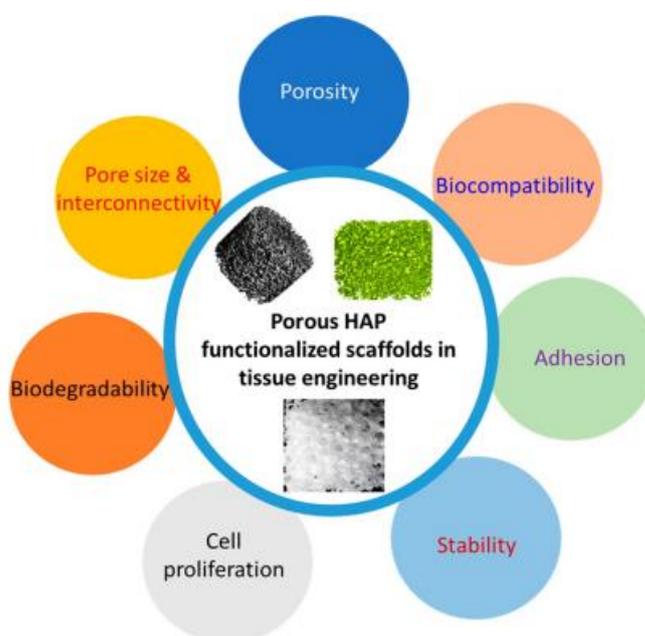


Figura 9. Proprietà degli scaffold funzionalizzati con HAp richieste per applicazioni in *tissue engineering*¹⁹.

Vetri bioattivi

Nonostante le numerose possibili applicazioni dei ceramici, i vetri bioattivi sembrano essere in genere più versatili grazie alla possibilità di poter modificare la composizione aggiungendo ioni terapeutici o sostanze.

La scoperta di tale tipologia di materiali risale al 1969. Le scoperte più significative sono avvenute grazie a scienziati quali Hench, Splinter, Allen e Greenlee che individuarono come una certa composizione di $Na_2O - CaO - P_2O_5 - SiO_2$ formi uno strato di vetro aderente all'osso. Fino al 1973, la seconda frontiera era rappresentata dallo sviluppo di test in vitro e in vivo che stabilissero i meccanismi e i limiti del legame tra vetri-bioattivi e vetro-ceramiche con l'osso. I test in vitro indicavano che il primo vetro bioattivo prodotto (45S5 Bioglass®) sviluppava uno strato di HA nelle soluzioni di prova. Questa fase di HA che si formava sugli impianti in vitro era equivalente ai cristalli di HA interfacciali osservati in vivo nelle micrografie a trasmissione elettronica dell'interfaccia legata, realizzate dal dott. Greenlee. I cristalli di HA in vivo erano legati a strati di fibrille di collagene prodotte all'interfaccia dagli osteoblasti. Il legame chimico dello strato di HA con il collagene creava una forte interfaccia legata.

Nel 2006, esordisce sul mercato il primo vetro bioattivo con composizione diversa da quella del 45S5, ovvero l'S53P4, meglio noto come BonAlive®, che ricevette l'approvazione europea per l'utilizzo ortopedico come sostituto dei *graft* ossei. Si tratta di un vetro con un maggiore contenuto di silice, motivo per cui ci si aspettava una minore bioattività.

In genere, i vetri bioattivi disponibili in commercio sono composti da SiO_2, Na_2O, CaO e P_2O_5 in proporzioni specifiche. Tali proporzioni differiscono dai tradizionali vetri sodico-calcici per il basso contenuto di silice (meno del 60% mol), l'alto contenuto di sodio e calcio e l'elevato rapporto calcio/fosforo che promuove la formazione di cristalli di apatite. Inoltre, gli ioni di calcio e silice possono agire come nuclei di cristallizzazione.

I vetri bioattivi hanno formulazioni differenti. Alcuni si legano ai tessuti molli e all'osso (come il 45S5), mentre altri solo all'osso (come il Ceravital®), altri ancora non formano alcun legame e, dopo l'impianto, vengono incapsulati in tessuto fibroso non aderente, mentre altri sono completamente riassorbiti nel giro di poche settimane. Le polveri fini si riassorbono più rapidamente rispetto ai materiali massivi. Uno strato sottile di apatite si forma all'interfaccia vetro-tessuto, facilitando la formazione di un legame forte con l'osso. Alcune formulazioni possono facilitare la crescita degli osteoblasti attraverso il materiale.

In base alla composizione, si possono individuare quattro classi di biovetri:

1. 35-60% mol di SiO_2 , 10 – 50% mol di CaO , 5 – 40% mol di Na_2O : bioattivi, si legano all'osso; alcune formulazioni si legano anche ai tessuti molli.
2. $< 35\%$ mol di SiO_2 : non formano vetri.
3. $> 50\%$ mol di SiO_2 , $< 10\%$ mol di CaO , $< 35\%$ mol di Na_2O : bioattivi, si riassorbono entro 10-30 giorni.
4. $> 65\%$ mol di SiO_2 : non bioattivi, quasi inerti, vengono incapsulati in tessuto fibroso.

Spesso, parte del CaO può essere sostituito con MgO e parte del Na_2O con K_2O senza influenzare il legame osseo; tuttavia, ciò modifica la velocità di dissoluzione del vetro. L'aggiunta di B_2O_3 o Al_2O_3 può facilitare la lavorazione del materiale, ma influisce sul legame osseo; l'allumina inibisce il legame, motivo per cui viene limitata a livelli ridotti (1-1,5%).

Alcuni studi hanno dimostrato che anche i vetri privi di fosfato mostrano bioattività. Il ruolo del fosfato è solo quello di favorire la nucleazione dell'apatite sulla superficie; gli ioni fosfato adsorbiti dall'organismo stesso possono svolgere lo stesso ruolo.

In base alla loro funzione, i vetri bioattivi possono essere suddivisi in due categorie:

- Classe A: **osteoinduttivi**; si legano sia ai tessuti molli che all'osso. Lo strato di HCA si forma entro poche ore.
- Classe B: **osteoconduttivi**; non favoriscono il legame con i tessuti molli. Lo strato di HCA si forma in un periodo di tempo che va da uno a diversi giorni.

Variando le proporzioni dei componenti, variano le proprietà del biovetro che può essere bioinerte, biorassorbibile o bioattivo, come si vede dalla figura [Fig.10].²¹

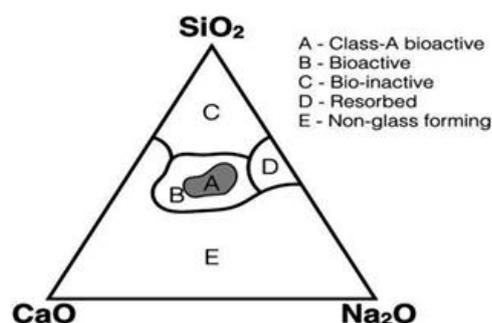


Figura 10. Variazione delle proprietà dei materiali biovetrosi in seguito alla variazione della composizione²¹.

Tecniche di produzione dei vetri bioattivi

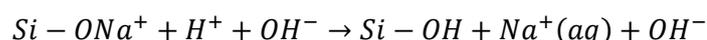
Le tecniche più comuni per la produzione di vetri bioattivi sono la fusione tradizionale e tempra, oppure la tecnica sol-gel. Nel metodo di fusione e tempra, il vetro viene preparato mescolando quantità

stechiometriche di ossidi o carbonati ad alta purezza (99,9%) che vengono inizialmente mescolati in un mulino a sfere in un mezzo di acetone. La polvere ottenuta viene poi fusa a temperature elevate in un forno ad alta resistenza, a seconda della composizione scelta. Il materiale fuso viene quindi versato in stampi per produrre barre/cilindri o altre forme desiderate. In alternativa, il fuso può essere temprato in aria o in acqua utilizzando piastre di rame o di ottone per ottenere frammenti di vetro. Il vetro temprato viene poi ricotto a 500°C per eliminare le tensioni interne. Questo metodo presenta alcuni svantaggi in quanto i vetri contenenti una percentuale di ossido alcalino inferiore al 10% sono in genere difficili da fondere a causa della viscosità elevata. Inoltre, il contenuto di silice dovrebbe essere inferiore al 60% mol per consentire al vetro di legarsi all'osso quando questo è ottenuto mediante fusione e tempra. Al contrario, utilizzando il metodo sol-gel, la formazione dello strato di HAp e il legame osseo possono essere agevolmente ottenuti anche con vetri contenenti fino al 90% molare di silice. Il processo sol-gel è utilizzato per preparare scaffold porosi di alcuni vetri bioattivi con pori interconnessi ma anche per realizzare rivestimenti e particelle. Questo processo prevede diverse fasi, tra cui idrolisi, polimerizzazione, gelificazione, essiccazione e disidratazione. Il sol evolve verso la formazione di un sistema bifasico simile a un gel (grazie all'aiuto di tensioattivi) contenente sia una fase liquida che una fase solida. I nanopori che si vengono a formare conferiscono al vetro un'elevata area superficiale, ci si aspetta quindi una maggiore velocità di formazione dello strato di idrossiapatite rispetto ad impalcature di vetro ottenute con tecniche di fusione e tempra con le medesime composizioni. Il metodo sol-gel permette di produrre vetri con elevata purezza e maggiore omogeneità, richiedendo una temperatura di lavorazione inferiore. Tuttavia, con questa metodica si ottengono vetri con bassa resistenza meccanica, quindi possono sostituire difetti solo in siti a basso carico.²²

Formazione dello strato di idrossiapatite

L'accumulo dei prodotti di dissoluzione provoca un cambiamento sia nella composizione chimica che nel pH della soluzione, creando siti di nucleazione sulla superficie e un pH favorevole alla crescita di idrossicarbonapatite (HCA). Sono stati proposti cinque stadi che permettono di semplificare il meccanismo di bioattività dei biovetri nei fluidi corporei in vivo o in SBF in vitro:

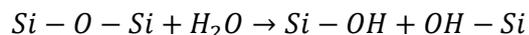
1. Scambio ionico tra cationi: Na⁺ e Ca²⁺ vengono scambiati con H⁺ dalla soluzione, creando legami silanolo (Si-OH) sulla superficie del biovetro:



Il pH della soluzione aumenta e avviene la formazione di una regione ricca di silice (povera di cationi) vicino alla superficie del vetro. Il fosfato eventualmente presente sul vetro viene perso in questo passaggio.

2. Attacco della rete di silice da parte di OH⁻: l'aumento del pH locale porta alla rottura dei legami

Si-O-Si nella rete vetrosa. La silice solubile viene persa sotto forma di $Si(OH)_4$ nella soluzione, lasciando più Si-OH (silanoli) all'interfaccia vetro-soluzione:



3. Condensazione dei gruppi Si-OH: Ripolimerizzazione dello strato ricco di silice vicino alla superficie del vetro (formazione di uno strato di gel di silice con spessore pari a 1-2 μm).

4. Migrazione di Ca^{2+} e gruppi PO_4^{3-} : i cationi migrano attraverso lo strato ricco di silice e della soluzione, formando un film di ricco di CaO e P_2O_5 amorfo sullo strato ricco di silice.

5. Incorporazione di idrossili e carbonati: questi vengono incorporati dalla soluzione e il film di $CaO - P_2O_5$ cristallizza in HCA.

È stato evidenziato in alcuni studi che la variabile che ha maggiore influenza sulla velocità di formazione dello strato di HCA e sul legame con l'osso è la composizione del vetro (quindi le concentrazioni di Ca^{2+} e $Si(OH)_4$ sono parametri critici in questo contesto). Una volta che lo strato di HAp si è formato, i meccanismi biologici di legame con l'osso comprendono l'adsorbimento di fattori di crescita, l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule osteoprogenitrici, oltre all'adsorbimento di proteine (quali fibronectina, vitronectina, ecc.), necessarie per l'adesione cellulare.^{22,23}

Biovetri commerciali

I vetri bioattivi furono approvati per la prima volta nel 1985 dalla FDA, seguita da altre agenzie internazionali. Da allora, un totale di 24 vetri bioattivi sono stati approvati per uso commerciale, principalmente nell'ambito delle applicazioni per i tessuti duri, anche se i dispositivi approvati hanno diverse applicazioni.²⁴

BoneAlive®(S53P4)

Tra i biovetri più utilizzati in ambito biomedico, emerge il vetro bioattivo BoneAlive® S53P4, osteoconduttivo e osteoinduttivo in quanto permette migrazione, replicazione e differenziazione delle cellule osteogeniche e produzione della loro matrice. Si tratta del primo vetro bioattivo commerciale ad avere composizione differente da quella del 45S5, citato precedentemente. La sua composizione in peso prevede 53%wt di SiO_2 , 23%wt di Na_2O , 20%wt di CaO , 4%wt di P_2O_5 .²⁵ Quando questo viene immesso all'interno del corpo in forma di granuli, si verificano una serie di reazioni chimiche (già viste precedentemente) che creano le condizioni ideali per la ricostruzione ossea. Una volta formato lo strato di HA, il vetro bioattivo interagisce con proteine del sangue, fattori di crescita e collagene, permettendo così la crescita del tessuto osseo tra le strutture del vetro bioattivo. Segue infine una fase conclusiva del processo durante cui continuano la rigenerazione e la rimodellazione dell'osso, restaurando gradualmente l'anatomia del paziente. S53P4 è stato utilizzato in svariati campi medici,

tra cui il trattamento delle infezioni a livello osseo grazie al rilascio di ioni, trattamento di fratture ossee, chirurgia spinale, chirurgia mastoidea.²⁶⁻²⁹

Formazione del biofilm batterico

I dispositivi medici, sia impiantabili che non, possono essere soggetti a contaminazione batterica con conseguente formazione del cosiddetto biofilm batterico, il quale può portare ad infezioni dannose per il paziente e compromettere il funzionamento del suddetto dispositivo. È quindi di fondamentale importanza trattare tempestivamente le infezioni batteriche per prevenire danni. Da questa necessità deriva la ricerca di strategie preventive efficaci e di un costante monitoraggio per ridurre il rischio di infezioni e garantire la funzionalità dei dispositivi. I metodi tradizionali prevedono l'utilizzo di terapie antibiotiche, il cui abuso porta ad effetti collaterali con la conseguente perdita di efficacia a causa dell'aumento della resistenza batterica sul lungo periodo.

Quando i batteri colonizzano una determinata superficie, questi si aggregano formando il biofilm, ovvero una matrice extra-cellulare (ECM) prodotta dai batteri stessi una volta che aderiscono ad una qualsiasi superficie, proteggendo la popolazione batterica da agenti esterni.

La formazione del biofilm batterico è il risultato di diversi processi fisici, chimici e biologici e può essere riassunta in cinque fasi. Tali passaggi includono un'iniziale adesione reversibile dei microrganismi planctonici ad una determinata superficie, una transizione dall'adesione reversibile a quella irreversibile durante la formazione del biofilm attraverso la produzione di sostanze polimeriche extracellulari (EPS). Successivamente, si ha lo sviluppo del biofilm maturo, seguito dalla dispersione delle cellule del biofilm nell'ambiente circostante [Fig.11].³⁰

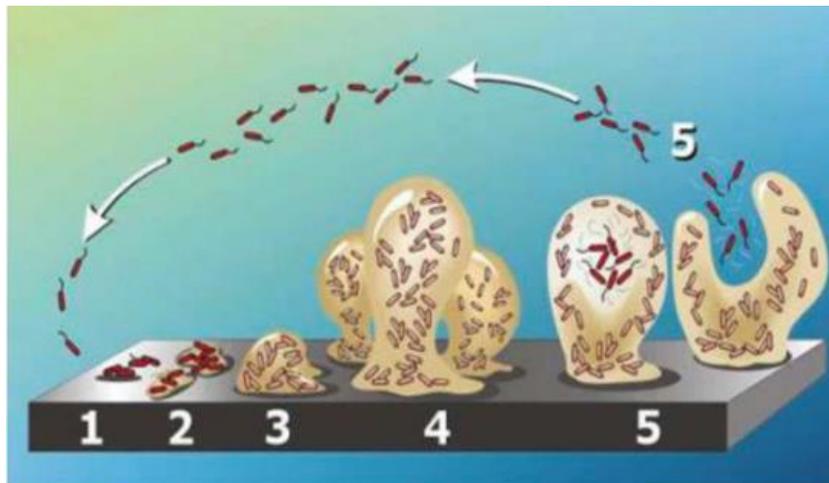


Figura 11. Meccanismo di formazione del biofilm batterico³⁰.

I batteri presenti all'interno del biofilm presentano differenti caratteristiche rispetto alle loro controparti in forma planctonica, tra cui una diversa fisiologia e un'elevata resistenza al sistema immunitario e agli antibiotici. Tale variazione può dipendere da fattori ambientali, quali il livello di nutrienti, la temperatura o il pH.

L'adesione batterica può essere inoltre influenzata dalle caratteristiche della superficie su cui avviene l'adesione, tra cui bagnabilità e rugosità.

Volendo intervenire sul debellamento dell'infezione batterica, bisogna prima riconoscere le tipologie di batteri esistenti. Fondamentalmente, questi si dividono in due classi: Gram-positivi e Gram-negativi.

Tali tipologie di batteri differiscono principalmente per la composizione della membrana: i Gram-positivi presentano infatti uno spesso strato esterno di proteoglicani (da 28 a 80 nm) che circonda la membrana. I Gram-negativi presentano invece una membrana plasmatica interna avvolta da un sottile strato di proteoglicani (2-3 nm) a sua volta circondato da un'ulteriore membrana esterna composta da lipidi, polisaccaridi e componenti proteici [Fig. 12]³¹.

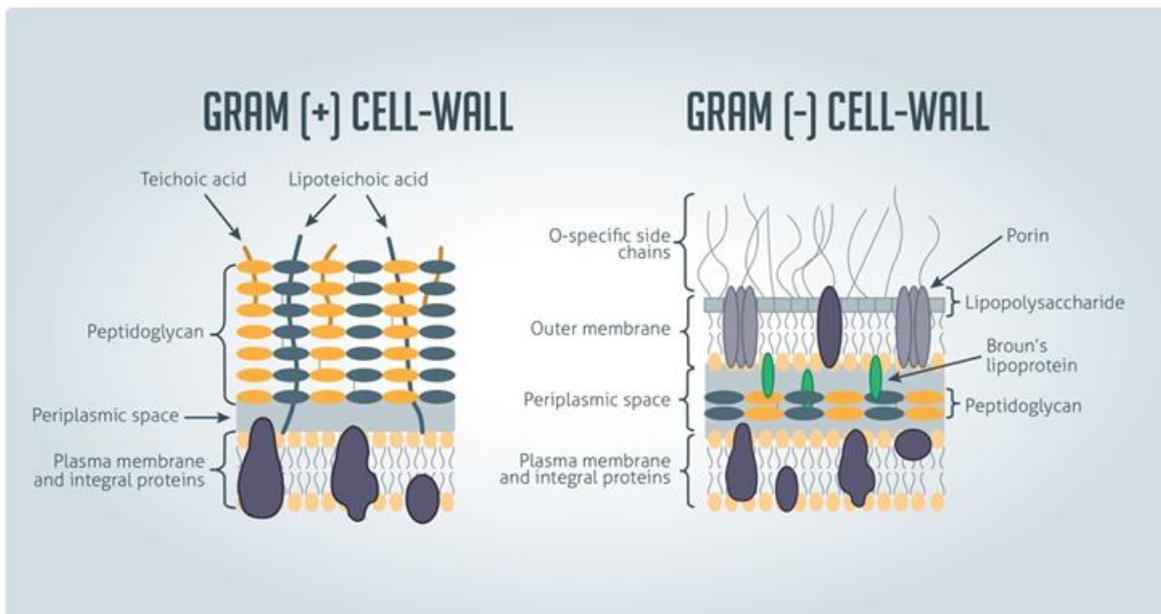


Figura 12. Differenze tra la membrana cellulare dei batteri Gram-positivi e quella dei batteri Gram-negativi³¹.

Strategie per il trattamento delle infezioni batteriche

Le infezioni batteriche sono generalmente trattate mediante l'utilizzo di antibiotici, per somministrazione locale o sistemica. Tuttavia, questo approccio può portare ad un aumento della resistenza batterica con una diminuzione dell'efficacia del trattamento. Si è quindi cercata una strada alternativa, prediligendo ad esempio l'utilizzo di ioni inorganici con potere antibatterico o modificando le superfici dei dispositivi per renderle sfavorevoli all'adesione batterica o per uccidere la popolazione batterica una volta avvenuta l'adesione.

Utilizzo di ioni con funzione antibatterica

Tra gli ioni di natura inorganica più utilizzati emergono argento, rame e zinco.

Rame

Il rame è un metallo abbastanza resistente alla corrosione, grazie alla formazione di uno strato di ossido che si sviluppa spontaneamente sulla superficie. Questa sua caratteristica lo rende batteriostatico, ostacolando la proliferazione dei batteri sulla sua superficie.

Gli ioni di rame (Cu^+ e Cu^{2+}), carichi positivamente, interagiscono con la superficie del batterio, ricca di gruppi chimici carichi negativamente, come i tioli (-SH) e i carbossilici. Questa interazione porta ad

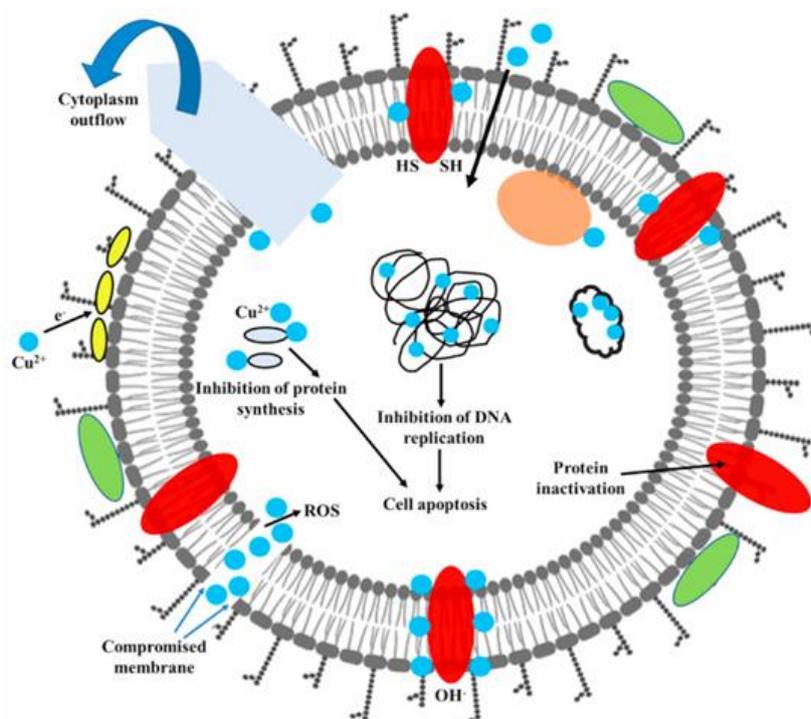


Figura 13. Schema del meccanismo di azione antimicrobica del rame³².

una destabilizzazione della membrana che si traduce nella perdita di componenti vitali, come proteine, enzimi e ioni essenziali. Il batterio, privato della sua protezione naturale, diventa estremamente

vulnerabile e non è più in grado di mantenere il proprio equilibrio interno, portando rapidamente alla sua morte [Fig.13]³².

Un altro aspetto fondamentale dell'attività antibatterica del rame riguarda la produzione di specie reattive all'ossigeno (ROS). Quando gli ioni di rame interagiscono con l'ambiente cellulare, catalizzano reazioni chimiche che generano radicali liberi altamente tossici per i batteri, in quanto possono attaccare i lipidi di membrana, inibire la funzionalità delle proteine o distruggere DNA e RNA [Fig.13].

Il rame si comporta anche come un potente inibitore enzimatico, sabotando le attività metaboliche essenziali per la sopravvivenza del batterio. Quando il rame si lega a strutture molecolari contenenti gruppi tioli, gli enzimi del batterio perdono la propria funzionalità portando a conseguenze fatali, quali blocco della produzione di ATP, inibizione della sintesi proteica e interruzione della riparazione del DNA.

Un aspetto rivoluzionario dell'applicazione moderna del rame è l'utilizzo di tale metallo in forma di nanoparticelle (Cu NPs) che ne amplificano il potenziale antimicrobico grazie alla loro elevata area di contatto rispetto al rame in forma massiva, permettendo un rilascio più uniforme e rapido dei suoi ioni.

Nella medicina rigenerativa e negli impianti medici, il rame viene integrato in dispositivi come protesi, impianti dentali e intrauterini, grazie alla sua capacità di inibire la formazione di biofilm batterici senza comprometterne la biocompatibilità. Rivestimenti a base di rame su dispositivi ortopedici e dentali riducono significativamente il rischio di infezioni post-operatorie, migliorando la durata e la sicurezza degli impianti. In quest'ambito, è interessante lo studio di Sh. Soltani-Dehnavi et al che dimostra come, miscelando nanopolveri di rame con le polveri di vetro bioattivo, si ottengano proprietà antibatteriche principalmente contro batteri Gram-negativi³³.

Per quanto riguarda il trattamento delle ferite, i bendaggi arricchiti con nanoparticelle di rame favoriscono la guarigione, prevenendo le infezioni e accelerando la rigenerazione dei tessuti. La combinazione con polimeri biocompatibili, come il chitosano, amplifica l'efficacia antimicrobica mantenendo la sicurezza per l'uso umano³².

Durante la pandemia da COVID-19, le proprietà antivirali del rame sono state sfruttate per la produzione di dispositivi di protezione individuali, tra cui mascherine con rivestimenti in rame, capaci di inibire il virus SARS-CoV-2 in pochi minuti. Questa caratteristica ha reso il rame un alleato fondamentale nella gestione della crisi sanitaria globale.

Infine, nel campo delle superfici autopulenti, rivestimenti a base di rame sono stati applicati su arredi ospedalieri e dispositivi medici per ridurre drasticamente la carica microbica. Ospedali che hanno implementato queste tecnologie hanno registrato una significativa riduzione delle infezioni correlate

all'assistenza sanitaria, diminuendo significativamente la presenza di batteri pericolosi quali *Staphylococcus Aureus* ed *Escherichia coli*. Studi dimostrano che il rame è in grado di eliminare fino al 99,9% dei batteri entro due ore dal contatto, rendendolo un efficace strumento di prevenzione delle infezioni nosocomiali³².

Zinco

Lo zinco è un metallo moderatamente reattivo e può essere usato nei rivestimenti come nanoparticelle di ossido di zinco (ZnO). È in grado di interagire con la superficie di agenti patogeni, presentando comportamenti battericidi. L'attività antibatterica delle nanoparticelle di ossido di zinco potrebbe essere dovuta alla presenza di ioni Zn²⁺ solubili, che si formano quando l'ossido è sospeso in acqua o si verificano variazioni del pH. In uno studio del 2021, viene dimostrato come un vetro bioattivo ad elevato contenuto di fosfato drogato con zinco abbia un potere antibatterico nei confronti di specie sia Gram-positive che Gram-negative³⁴.

Argento

L'argento si presenta come una lama a doppio taglio: da un lato presenta proprietà antibatteriche, dall'altro aumenta la citotossicità se sovradosato. Gli ioni argento hanno la capacità di legarsi ai gruppi tioli presenti in molte proteine, alterandone le funzioni. Questo può portare alla morte cellulare per apoptosi e alla rottura delle membrane cellulari dei batteri. Gli ioni argento presentano poi un'azione multipla, in quanto sono anche in grado di interagire con numerosi enzimi coinvolti nei processi metabolici delle cellule, interferendo con la replicazione del DNA e la divisione cellulare. Questo genere di versatilità ha permesso di superare alcuni limiti associati all'utilizzo degli antibiotici tradizionali, in quanto si riscontra una diminuzione della resistenza batterica e lo spettro di attività diventa più ampio. In uno studio, Pandey et al, hanno dimostrato le proprietà antibatteriche dell'argento sviluppando un biocomposito a base di idrossiapatite (HA) rinforzato con nanoparticelle di argento e ceria (CeO₂) per impianti ortopedici. I risultati di tale indagine hanno quindi messo in evidenza come il biocomposito HA-Ag ha mostrato una maggiore efficacia antibatterica del 61% contro *E. Coli* (Gram-negativo) e del 53% contro *S. Aureus* (Gram-positivo).^{35,36}

In sintesi, l'incorporazione degli ioni inorganici sopracitati nei materiali può avvenire attraverso diverse tecniche, quali deposizione fisica (evaporazione o sputtering), deposizione chimica (PVD o sol-gel) o tecniche di trattamento superficiale (ionizzazione, irradiazione laser o trattamenti termici). È infine fondamentale ottimizzare la concentrazione e il rilascio di tali ioni per garantire un'efficace azione antibatterica e minimizzare al contempo potenziali effetti citotossici. Tuttavia, quando si apportano modifiche chimico-fisiche alla superficie di un biomateriale, si altera di conseguenza l'interazione con

l'organismo ospite, influenzando la risposta immunitaria. Si può quindi tentare di rendere i materiali antibatterici mediante altre strategie.

Superfici antimicrobiche

Come detto precedentemente, i batteri presentano una maggiore tendenza a formare colonie sullo strato di materiale a cui aderiscono: si può quindi tentare di modificare la topografia delle superfici coinvolte in modo tale da renderle antiadesive al fine di sfavorire la colonizzazione batterica. Alternativamente, si possono indurre modifiche superficiali che conferiscano proprietà battericide, per indurre la rottura della membrana cellulare del batterio una volta avvenuta l'adesione sulla superficie. Si potrebbe anche pensare di convogliare su una superficie entrambe le proprietà per aumentare il raggio di azione.

Superfici antiadesive (antibiofouling)

Le superfici *antibiofouling* (antiadesive o batterio-repellenti) impediscono l'attacco batterico attraverso meccanismi non citotossici basati sulla modifica della chimica o della topografia superficiale. Queste superfici in genere hanno un raggio d'azione limitato e sono efficaci solo in prossimità della zona di contatto. La bagnabilità di una superficie è stata identificata come un fattore chiave nell'adesione batterica. È stato ampiamente dimostrato che l'aumento dell'idrofobicità migliora l'efficienza antibatterica³⁷. Come esempio, si riporta lo studio di Kong et al, dove è stata progettata una membrana nanofibrosa a base di poli(ϵ -caprolattone)-chitosano/oligosaccaride di chitosano (PCL-CS/COS) per medicazioni delle ferite, evidenziando che le sue proprietà antibatteriche derivano dall'elevata idrofobicità (angolo di contatto pari a circa 130°) dello strato di PCL³⁸. La definizione di superidrofobicità deriva dalla misura dell'angolo di contatto: quando questo è maggiore di 150°, la superficie si definisce superidrofobica. In natura esistono diversi tipi di superfici superidrofobiche, la più nota è la foglia di loto. Questa presenta un angolo di contatto pari a 162° e le proprietà evidenziate nascono dalla micro e nanostruttura superficiale caratterizzata dalla presenza di micro-papille rivestite con nanocristalli idrofobici a base di cera: quando una goccia d'acqua entra a contatto con la foglia, tocca solo alcuni punti delle estremità rugose costituenti le papille, tra cui sono presenti dei cuscinetti d'aria. Questo determina una bassa adesione tra foglia e superficie: la goccia tenderà a rotolare facilmente andando a ripulire la foglia [Fig.14]³⁹.

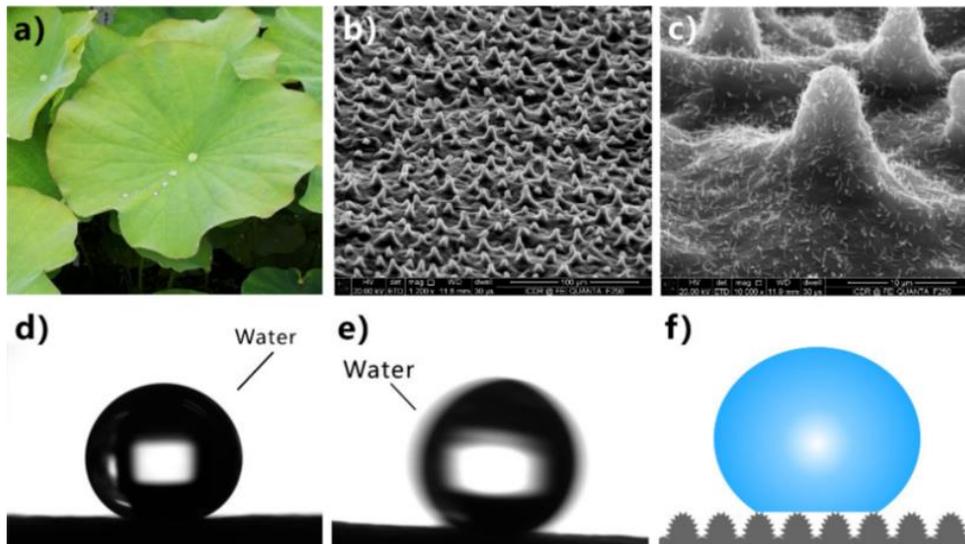


Figura 14. Superidrofobicità delle foglie di loto. (a) Foglie di loto. (b,c) Immagini al SEM della microstruttura superficiale di una foglia di loto. (d,e) Una goccia d'acqua su una foglia di loto (statica e in movimento). (f) Diagramma schematico dello stato di contatto tra una goccia d'acqua e la foglia di loto³⁹.

Le superfici superidrofobiche sono note per trattenere sacche d'aria all'interno delle loro nanostrutture, riducendo la forza di adesione batterica e ostacolando di conseguenza l'adesione superficiale. Lo strato d'aria riduce anche l'area di contatto tra la superficie e la cellula batterica, impedendone ulteriormente l'adesione⁴⁰. Studi approfonditi⁴¹ hanno permesso di identificare tre fattori chiave che permettono di garantire proprietà antibatteriche. Bisogna evidenziare prima di tutto che la presenza di sacche d'aria genera una forza di pressione di Laplace diretta contro i batteri che deve superare la forza di adesione batterica. In secondo luogo, si evidenzia una ridotta area di contatto del substrato che impedisce l'adesione diretta delle cellule batteriche. Infine, la diminuzione della forza di attrazione di van der Waals riduce la possibilità che i batteri rimangano adesi alla superficie. Nei batteri Gram-positivi e Gram-negativi, i peptidoglicani (PGN) e i lipopolisaccaridi (LPS) sono componenti essenziali della membrana cellulare e regolano il meccanismo di adesione batterica. La resistenza delle superfici superidrofobiche a PGN e LPS è dovuta alla loro struttura gerarchica unica, che intrappola le sacche d'aria su scala nanometrica, riducendo così l'interazione idrofobica tra batterio e substrato.

Superfici battericide

La topografia superficiale alla scala micro/nanometrica può essere plasmata sia per inibire l'adesione e la crescita batterica, come visto precedentemente, sia per provocare la lisi delle cellule batteriche. Per garantire un effetto battericida è necessario ottimizzare alcuni parametri superficiali, quali rugosità, densità o disomogeneità delle altezze delle asperità. Volendosi ispirare alla natura, molti studi hanno fatto riferimento alle ali della cicala. In uno di questi (Ivanova et al.)⁴², sono stati ipotizzati come fondamentali nella rottura delle membrane cellulari dei batteri i *nanopillar* presenti sulle ali della

cicala. Successivamente, Kelleher et al. hanno analizzato tre sottospecie di ali di cicala, trovando importanti correlazioni tra le loro proprietà battericide e le nanostrutture superficiali⁴³. In generale, si può affermare che il processo di adesione superficiale di un batterio è mediato dalla topografia superficiale poiché, quando un organismo (nello specifico un batterio Gram-negativo) cerca di aderire alla struttura nanometrica, questo deforma la sua membrana, arrivando alla rottura della stessa [Fig.15]⁴⁴. Questo stesso meccanismo, tuttavia, non vale per i batteri Gram-positivi in quanto dotati di una membrana più spessa e, di conseguenza, più difficile da rompere. È pertanto aumentato l'interesse verso questa tipologia di superfici poiché, mediante la semplice sagomatura di un impianto biomedicale, si può ottenere un dispositivo con effetto battericida.

Altro esempio simile riguarda la pelle del gecko che presenta pillar alti ma con una struttura molto diversa. In questo caso, si hanno dei pillar sottili, alti e piuttosto distanziati tra loro (700nm di spaziatura). Questa tipologia di rugosità determina la morte dei batteri Gram-negativi ma non quella dei

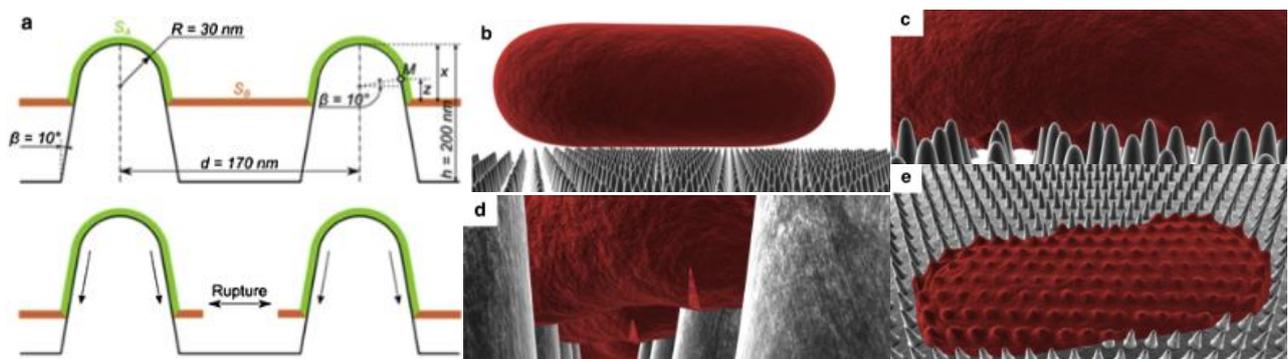


Figura 15. Modello biofisico dell'interazione tra i *nanopylars* dell'ala di cicala (*P. claripennis*) e le cellule batteriche. (a) Rappresentazione schematica dello strato esterno di un batterio che viene adsorbito sui *nanopylars* dell'ala di cicala. Lo strato adsorbito può essere suddiviso in due regioni: regione A (a contatto con i *nanopylars*) e regione B (sospesa tra i *nanopylars*). Man mano che la regione A si adsorbe, la regione A si adsorbe e la sua area superficiale (S_a) aumenta, mentre la regione B subisce un allungamento e infine si rompe. (b-e) Rappresentazione tridimensionale delle interazioni modellate tra una cellula a forma di bastoncino e la superficie dell'ala. Quando la cellula entra in contatto (b) e si adsorbe (c), lo strato esterno inizia a rompersi nelle regioni tra i *nanopylars*, collassando sulla superficie (e)⁴⁴.

Gram-positivi i quali, avendo dimensioni molto ridotte, tendono ad infilarsi tra due pillar. In natura, l'unico esempio in grado di determinare la morte di entrambe le tipologie di batteri è fornito dalle ali di libellula. Queste presentano *nanopylars* con un'altezza pari a circa 240-300 nm (mentre nelle ali di cicala si raggiungevano al massimo 200 nm). Essendo più alti i pillar e disposti in maniera casuale, vi è una maggiore possibilità di deformazione dei batteri Gram-positivi, anche se più piccoli, e quindi maggiore possibilità di rottura [Fig.16]⁴⁵.

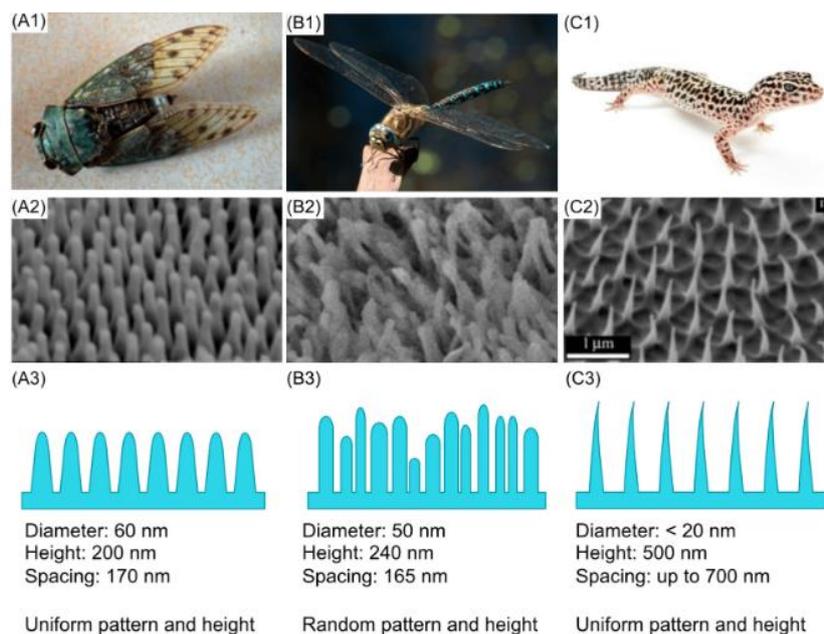


Figura 16. Superfici meccano-battericide presenti in natura: (A1-C1) Cicala, libellula e gecko, rispettivamente; (A2-C2) Immagini al SEM dell'ala di cicala, dell'ala di libellula e della pelle del gecko; (A3-C3) Rappresentazione schematica delle nanotopografie caratteristiche riscontrate sull'ala di cicala, sull'ala di libellula e sulla pelle del gecko⁴⁵.

La possibilità di replicare tali strutture e quindi realizzare superfici battericide nanostrutturate si ha utilizzando tecniche di fabbricazione quali *deep reactive ion etching* (DRIE) e *nanoimprint lithography* (NIL). Un'altra tecnica per la modifica delle superfici mediche è la nanostrutturazione al plasma, metodo che ha attirato particolare attenzione per la modifica di impianti e strumentazioni mediche^{46,47}, in quanto si pone come approccio semplice, a basso costo e applicabile su larga scala per creare superfici antibatteriche e biocompatibili.

Chitosano come materiale antibatterico

Una volta viste alcune delle strategie tradizionali, si può proporre un'alternativa per il conferimento di proprietà antibatteriche: si mettono dunque in risalto i polimeri che, utilizzati come coating o idrogeli, conferiscono al materiale proprietà antibatteriche. In questa categoria, si colloca il chitosano: un polisaccaride naturale lineare policationico derivato dalla deacetilazione della chitina elemento strutturale dell'esoscheletro di insetti, crostacei e della parete cellulare dei funghi. La produzione di questo polimero prevede quindi un processo in cui vengono rimossi i gruppi acetilici per formare i gruppi amminici. Il chitosano è riconosciuto come biomateriale versatile grazie all'assenza di tossicità, alla bassa allergenicità, alla biocompatibilità e alla biodegradabilità.

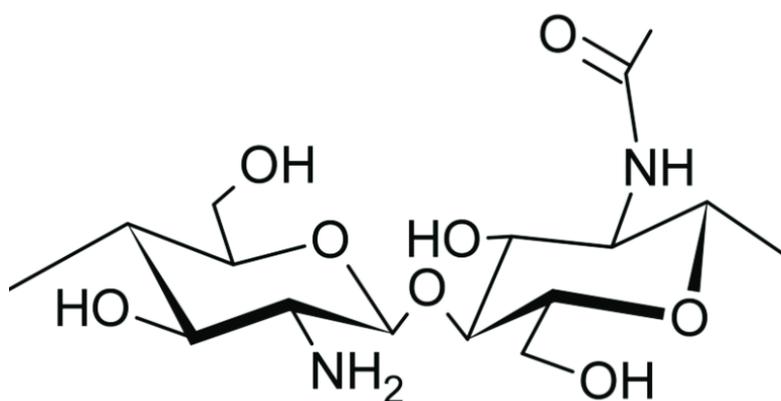


Figura 17. Struttura molecolare dell'unità ripetitiva del monomero del chitosano.⁴⁸

Physiochemical Characteristics	Method of Determination
molecular weight	viscometry; gel permeation chromatography; light scattering; high performance liquid chromatography; matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometer
degree of deacetylation	infrared spectroscopy; ultra violet spectrophotometry; nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹ H-NMR and ¹³ C-NMR); conductometric titration; potentiometric titration; differential scanning calorimetry
crystallinity	X-ray diffraction

Tabella 2. Caratteristiche fisico-chimiche del chitosano e relativo metodo di determinazione⁴⁹.

Il chitosano è composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina legate con legame β -(1-4) e distribuite in modo casuale all'interno della catena polimerica [Fig.17]⁴⁸. La natura cationica del chitosano è piuttosto peculiare poiché la maggior parte dei polisaccaridi sono solitamente neutri o possiedono carica negativa in ambiente acido. Questa proprietà gli consente di formare complessi elettrostatici o strutture multistrato con altri polimeri di origine sintetica o naturale, con carica negativa. Le applicazioni e le proprietà del chitosano dipendono dalle sue caratteristiche, ovvero l'aspetto del polimero, la torbidità della soluzione polimerica, il grado di deacetilazione e il peso molecolare. Queste

possono essere determinate mediante diverse tecniche di caratterizzazione, come si evince dalla tabella [Tabella 2]⁴⁹.

Le proprietà fisiche del chitosano in soluzione acquosa dipendono dal grado di deacetilazione e dalla distribuzione dei gruppi acetilici nelle catene polimeriche. Una distribuzione non uniforme dei gruppi acetilici ne riduce la solubilità e favorisce la formazione di aggregati. Questo problema di solubilità ne limita l'applicabilità. La modifica del chitosano a livello molecolare può aumentarne la stabilità e la solubilità, rendendolo più versatile.

Il chitosano reagisce solitamente con altre piccole molecole o polimeri, trasformandosi in derivati o compositi. Tra questi emerge l'*hydrogel* di chitosano, costituito da un reticolo di catene polimeriche con un elevato numero di gruppi idrofili. Esempi tipici includono idrogel di chitosano-poli(etilenglicole), idrogel di chitosano-ialuronico, composito di chitosano-alginato, composito di chitosano collagene, composito di chitosano-idrossiapatite⁵⁰. Questi materiali possono essere modellati in diverse forme (film, fibre, spugne, particelle sferiche e soluzioni) e sono principalmente utilizzati per la realizzazione di scaffold per l'ingegneria del tessuto osseo, sistemi di rilascio dei farmaci e materiali per la guarigione delle ferite.

Proprietà antibatteriche del chitosano

Il chitosano possiede un ampio spettro di azione e un'elevata velocità di uccisione nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi. L'attività antibatterica è il risultato delle interazioni tra il chitosano e i suoi derivati con le molecole della parete cellulare batterica. Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare l'attività antimicrobica del chitosano:

1. Interazione con la superficie della cellula batterica: le molecole di chitosano, cariche positivamente, interagiscono con i residui carichi negativamente sulla superficie dei batteri, alterando la permeabilità cellulare, il chitosano interagisce quindi con la membrana batterica, provocando delle alterazioni strutturali e possibile rottura.
2. Interazione con il DNA microbico: i prodotti di idrolisi del chitosano possono diffondere e interagire con il DNA microbico, inibendo la sintesi dell'mRNA e delle proteine essenziali per la crescita e la replicazione batterica.
3. Chelazione di nutrienti e metalli essenziali: il chitosano può limitare la crescita microbica sequestrando nutrienti e metalli essenziali, privando i batteri degli elementi necessari per la loro sopravvivenza.
4. Formazione di una barriera polimerica sulla superficie cellulare: Il chitosano può formare una membrana polimerica sulla superficie dei batteri, impedendo l'ingresso di nutrienti

essenziali. Inoltre, può agire come barriera contro l'ossigeno, limitando pertanto la crescita di batteri aerobi.

La combinazione di questi meccanismi rende il chitosano un efficace agente antimicrobico con un vasto spettro di applicazioni, specialmente nei settori alimentare e biomedico⁵¹. Tuttavia, non bisogna trascurare alcuni aspetti che influenzano tali proprietà.

Bisogna innanzitutto, considerare l'influenza del pH. Il chitosano, infatti, è policationico a pH inferiore a 6 e interagisce facilmente con sostanze cariche negativamente, quali proteine, polisaccaridi anionici, acidi grassi, acidi biliari e fosfolipidi, grazie all'alta densità di gruppi amminici presenti nel polimero. Non essendo ancora il meccanismo completamente noto, si ipotizza che la carica positiva sul gruppo NH₃⁺ del monomero di glucosamina a pH inferiore a 6,3 consenta interazioni con le membrane cellulari microbiche caricate negativamente, causando la fuoriuscita delle componenti intracellulari. Tale aspetto è stato dimostrato in numerosi studi⁵²⁻⁵⁵, motivo per cui si può affermare che l'attività antimicrobica del chitosano è più elevata quando il pH diminuisce, poiché i gruppi amminici del chitosano protonano.

Altro aspetto importante è costituito dal peso molecolare del chitosano. In base a questa proprietà, si possono infatti distinguere tre classi di polimero:

- Chitosano a basso peso molecolare (LMw) o a catena corta, con peso molecolare inferiore a 50 kDa;
- Chitosano a peso molecolare medio (MMw), con peso molecolare compreso tra 50 e 250 kDa;
- Chitosano ad elevato peso molecolare (HMw), con peso molecolare superiore a 250 kDa.

È stato dimostrato che la relazione tra l'effetto battericida e il peso molecolare è influenzata dal tipo di batterio coinvolto⁵⁶. Il chitosano ad elevato peso molecolare (HMw) non è in grado di attraversare le membrane batteriche e, di conseguenza, rimane sulla superficie cellulare, bloccando il trasporto dei nutrienti all'interno delle cellule microbiche e portando alla lisi cellulare. Tuttavia, una soluzione dissociata di molecole di chitosano HMw può legarsi alla membrana cellulare, modificandone la permeabilità e rendendo la cellula più vulnerabile. Al contrario, le soluzioni dissociate di molecole di chitosano a basso peso molecolare (LMw) possono penetrare nel nucleo cellulare e legarsi al DNA, inibendo la sintesi dell'RNA messaggero (mRNA). Sulla base degli studi condotti, si può infine affermare che il chitosano LMw è generalmente più efficace contro entrambe le classi batteriche, mentre HMw risulta meno efficace contro i batteri Gram-negativi a causa della complessità della loro membrana esterna⁵⁷⁻⁵⁹.

Altro parametro da monitorare è infine il grado di deacetilazione (DD) che influenza sia la solubilità che l'attività antibatterica del chitosano: è stato dimostrato che, quando aumenta il DD, aumenta anche la

carica positiva e quindi anche l'efficacia antibatterica. In uno studio, Byun et al. hanno evidenziato come un chitosano con DD pari all'81,56% avesse attività antibatterica superiore rispetto ad uno con DD pari al 62,71%, grazie alla maggiore solubilità. In un altro studio invece, Park et al. hanno evidenziato come un chitosano con un DD pari al 75% avesse attività antimicrobica maggiore rispetto a quelli con un grado di deacetilazione inferiore^{51,60,61}.

Utilizzo del chitosano in ambito biomedico

In letteratura, sono presenti molteplici riferimenti all'utilizzo del chitosano come materiale antibatterico in ambito biomedico. Si riportano in seguito alcuni esempi.

In uno studio di Mota et al.⁶² il chitosano viene utilizzato in ambito parodontale in combinazione con nanoparticelle di vetro bioattivo (BG-NPs) per produrre una membrana temporanea, fabbricata tramite *solvent-casting*, per la rigenerazione guidata dei tessuti e dell'osso. Si è visto come l'aggiunta delle nanoparticelle abbia migliorato la rigidità in ambiente umido, consentendo una maggiore stabilità strutturale. È stata anche messa in evidenza la capacità osteoconduttiva di tali membrane, dimostrata dalla formazione di uno strato di apatite quando immerse in fluido corporeo simulato (SBF). Dagli studi in vitro è stato poi osservato un incremento dell'attività metabolica e della proliferazione cellulare delle cellule del legamento parodontale umano (hPDL) e delle cellule stromali del midollo osseo umano (hBMSC) sulle membrane composite rispetto a quelle in chitosano puro. Tali membrane non mostrano citotossicità o segni di degradazione precoce, rendendole ideali per l'uso clinico nel trattamento dei difetti parodontali.

Recentemente, è stata invece progettata una membrana a doppio strato che mima sia i tessuti molli che quelli duri nel contesto della rigenerazione ossea guidata (GBR)⁶³. Lo strato rivolto al tessuto osseo era, in questo caso, costituito da vetro bioattivo drogato con zinco, mentre il lato rivolto ai tessuti molli combinava collagene e chitosano. I test effettuati hanno poi confermato le ottime proprietà di bioattività e biocompatibilità delle membrane, testate prima in SBF e in seguito sottoposte a test cellulari con differenti concentrazioni.

Alternativamente, recenti studi⁶⁴ propongono l'utilizzo di scaffolds composti di idrossiapatite e chitosano (HAp-CS), la cui combinazione offre ottime prestazioni meccaniche, elevata biocompatibilità e una spiccata capacità biomimetica. Inoltre, la struttura porosa e la reattività del composito HA-CS, ne consentono l'applicazione non solo per la riparazione ossea, ma anche come sistema di rilascio controllato dei farmaci direttamente in situ, quali antibiotici per la prevenzione di infezioni post-operatorie, farmaci antitumorali chemioterapici per migliorare l'efficacia terapeutica o molecole osteoinduttive (fattori di crescita) al fine di stimolare la proliferazione cellulare. Per la realizzazione di scaffold con elevata porosità viene in genere utilizzata la tecnica dell'*elettrospinning*

che permette di ottenere nanofibre ultrasottili, simile alle fibre presenti nella matrice extracellulare (ECM). Con l'evoluzione delle tecnologie di stampa 3D, gli scaffolds HA-CS sono stati impiegati anche per la creazione di strutture altamente personalizzate per la rigenerazione tissutale. In questo modo, si possono produrre scaffold con porosità controllata che permettano di migliorare la migrazione cellulare e la vascolarizzazione dei tessuti impiantati. Durante i processi di stampa 3D, HA e CS vengono combinati in un *bioink* e stampati strato per strato, con la possibilità di incorporare direttamente nel *bioink* cellule staminali e fattori di crescita, migliorando la capacità rigenerativa del materiale [Fig. 18].

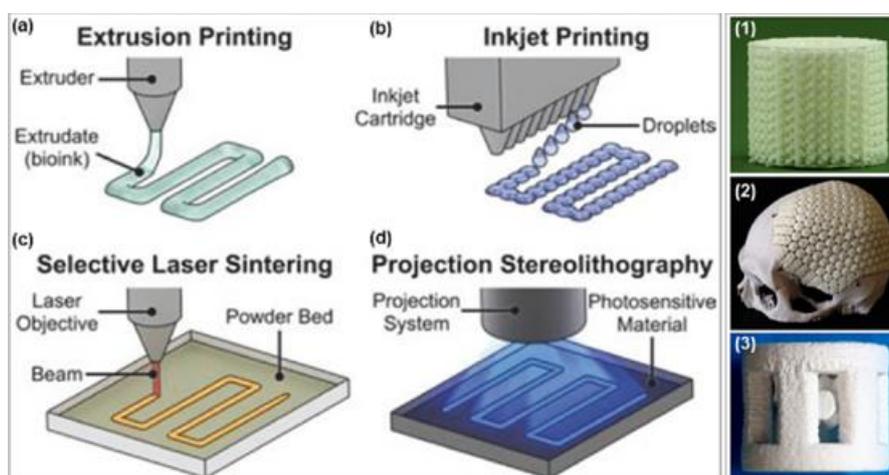


Figura 18. Tecniche di biostampa 3D comunemente utilizzate per la produzione di biomateriali: (a) Stampa per estrusione, (b) stampa per iniezione, (c) sinterizzazione laser selettiva, (d) stereolitografia. Esempi di scaffold progettati e stampati: (1), (2), (3)⁶⁴.

I compositi HA-CS possono infine essere utilizzati come rivestimenti bioattivi per impianti ortopedici e dentali. Questi vengono applicati sugli impianti in titanio, in modo tale da migliorarne l'osteointegrazione per aumentare l'adesione cellulare e ridurre il rischio di proliferazione batterica e, quindi, di rigetto. Quelli adibiti all'utilizzo nel settore dentale sono in genere realizzati mediante spin-coating, tecnica che garantisce la distribuzione uniforme del rivestimento su tutta la superficie dell'impianto, permettendo di ottenere un coating sottile ma che conserva la bioattività. Altra tecnica utilizzata in quest'ambito è l'*electrodeposition* che favorisce la crescita controllata di strati di HA e chitosano sulla superficie dell'impianto, in genere metallico. In questo modo è possibile ottenere un'elevata adesione del rivestimento al substrato, modulare lo spessore e la composizione del coating, nonché aumentare l'osteointegrazione.

Il chitosano può essere utilizzato anche in combinazione con materiali ceramici bioinerti, quali la zirconia, per applicazioni dentali. In particolare, in uno studio di Sellappan et al.⁶⁵, si tratta l'acciaio inossidabile 316L con un rivestimento duplex a base di nanochitosano e zirconia parzialmente stabilizzata con ittria (YSZ), impiegando due metodi di deposizione complementare: *electrophoretic*

deposition per il rivestimento in YSZ e dip coating per la deposizione del *layer* di chitosano sulla zirconia [Fig.19]⁶⁵. Nel dettaglio, è stata preparata una soluzione al 2% di chitosano in acido acetico glaciale, posto in agitazione continua per 10 ore al fine di ottenere una soluzione uniforme, i campioni rivestiti di zirconia sono poi stati immersi nella soluzione di chitosano per un tempo variabile (da uno a cinque minuti) e infine lasciati asciugare a temperatura ambiente per garantire l'uniformità del coating. Sono state condotte in seguito analisi di caratterizzazione tramite Diffrazione a raggi X (XRD), spettroscopia in trasformata di Fourier nell'infrarosso (FTIR) e microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FESEM) per individuare e verificare rispettivamente la struttura cristallina, la chimica superficiale e la morfologia. Dalle caratterizzazioni svolte emerge come la combinazione dei due rivestimenti abbia prodotto un coating stabile, omogeneo e altamente funzionale per applicazioni odontoiatriche, con potenziali benefici per la durata e l'efficacia degli impianti dentali.

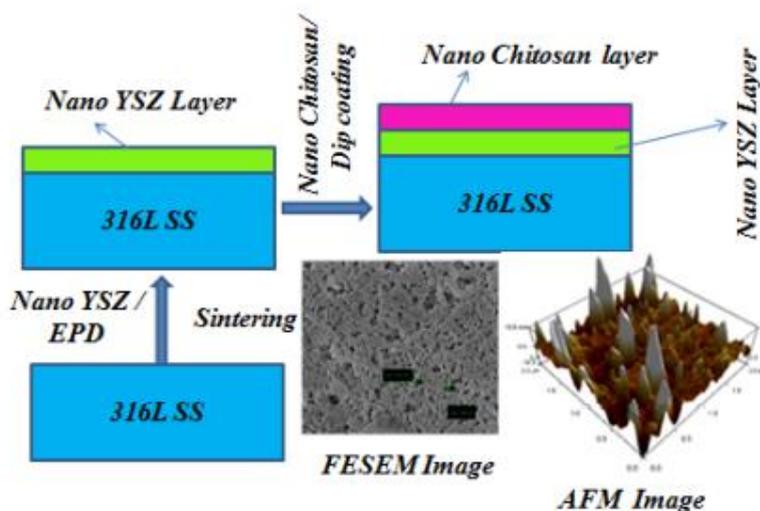


Figura 19. Rappresentazione schematica dello sviluppo di rivestimenti in nano-chitosano/nano YSZ (biocomposito) su acciaio inossidabile 316L per applicazioni dentali⁶⁵.

Attivazione e funzionalizzazione di superfici: trattamenti al plasma

La modifica superficiale tramite trattamento al plasma è una tecnica di trattamento superficiale efficace ed economica, ampiamente utilizzata per diversi materiali e di crescente interesse nell'ingegneria biomedica. Il vantaggio principale della modifica al plasma risiede nella possibilità di migliorare selettivamente le proprietà superficiali e la biocompatibilità del materiale sottoposto al trattamento, evitando di alterare le caratteristiche strutturali intrinseche. Nel contesto biomedico, la modifica superficiale al plasma si rivela particolarmente utile per migliorare l'adesione cellulare, la bioattività e la resistenza alla contaminazione batterica di materiali utilizzati per dispositivi medici. Le tecniche al plasma consentono di funzionalizzare le superfici tramite l'esposizione di gruppi funzionali, la rimozione di contaminanti, il miglioramento della bagnabilità e la deposizione di rivestimenti bioattivi. Questa tecnologia propone quindi un metodo efficace, scalabile ed ecocompatibile per ottimizzare le prestazioni dei biomateriali senza l'utilizzo di solventi chimici aggressivi o trattamenti termici invasivi.

Generalità del plasma e possibili applicazioni

Il plasma è definito come il quarto stato della materia ed è costituito da specie atomiche, molecolari, ioniche e radicaliche altamente eccitate e reattive. Si ottiene tipicamente quando un gas viene eccitato in stati energetici più elevati attraverso un campo magnetico in radiofrequenza (RF), microonde o tramite l'emissione di elettroni da un filamento caldo. Il plasma crea un ambiente chimico in cui possono avvenire numerose reazioni sulla superficie del materiale che viene sottoposto al trattamento. Esistono diversi metodi di modifica superficiale al plasma e differenti sorgenti, ciascuna adatta a specifici materiali e applicazioni.⁶⁶

Sorgenti di plasma gassoso

Di norma, un plasma gassoso viene generato applicando una tensione attraverso un gas, il cui potenziale di rottura dipende dalla pressione e dalla distanza tra gli elettrodi. In figura [Fig. 20], si mostra la relazione tra il potenziale di rottura dell'aria e la pressione, evidenziando che il valore minimo di tale

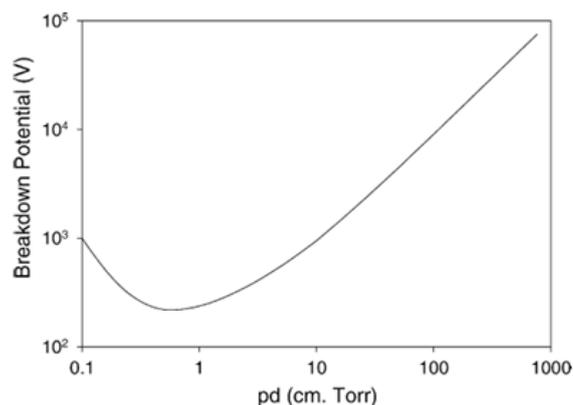


Figura 20. Relazione tra il campo elettrico di rottura dell'aria e la pressione⁶⁶

potenziale si aggira attorno a 0,7 Torr. Al di fuori di questa condizione ottimale il campo elettrico necessario per innescare la carica aumenta.⁶⁶

Nella figura successiva [Fig.21]⁶⁶, viene invece posto in evidenza l'andamento della corrente in funzione della tensione in una scarica di gas a bassa pressione, mettendo in risalto quattro regioni principali:

1. Scarica oscura (o di *Townsend*): fase iniziale in cui la ionizzazione è minima e non si osserva emissione luminosa;
2. Bagliore normale: il gas inizia a ionizzarsi stabilmente, generando un'emissione luminosa uniforme;
3. Bagliore anomalo: la corrente aumenta e la luminosità si intensifica, mentre la distribuzione della scarica si modifica;
4. Scarica ad arco: il plasma diventa altamente conduttivo e la tensione cala rapidamente, portando alla formazione di un arco elettrico.

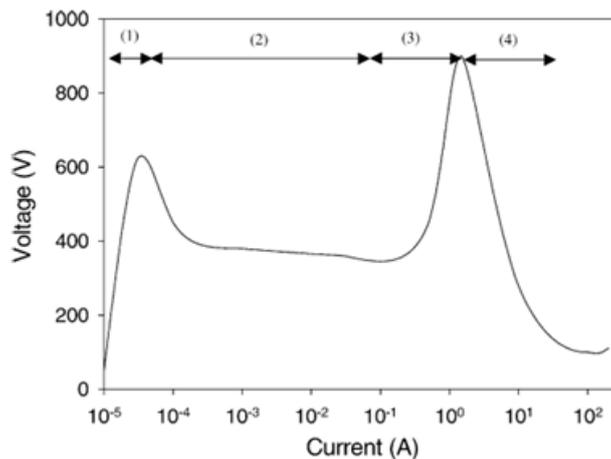


Figura 21. Caratteristiche corrente-tensione di una scarica a gas a bassa pressione a 1 Torr⁶⁶.

Per quanto riguarda invece la caratteristica corrente-tensione a pressione atmosferica, si può affermare che questa permette di distinguere due principali modalità di scarica: la scarica a corona, caratterizzata da una corrente molto bassa e dalla formazione di un plasma non termico, e la scarica

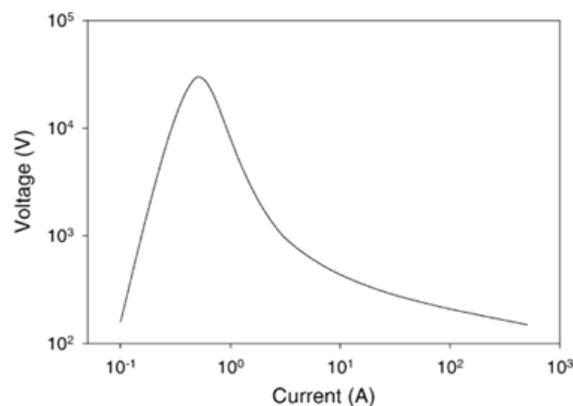


Figura 22. Sorgente al plasma rfGD accoppiata corrente-tensione⁶⁶

ad arco, dove il gas diventa altamente conduttivo e si riscontra un rapido calo della tensione all'aumentare della corrente [Fig.22]⁶⁶.

La scarica ad arco è ampiamente utilizzata in processi industriali come saldature, taglio e plasma *spraying*. Molte sorgenti di plasma a bassa pressione, come il plasma a corrente continua (DC), la scarica a bagliore in radiofrequenza (rfGD) e il plasma a risonanza ciclotronica (ECR), operano a basse pressioni perché il campo elettrico di rottura è inferiore e la corrente può essere controllata con maggiore precisione. Queste sorgenti consentono di generare plasma uniforme su ampie superfici, con una densità elettronica ben controllata. Alcune altre tipologie di plasma, come la scarica a corona e il plasma ad arco a pressione atmosferica, trovano anch'esse applicazione nell'ingegneria biomedica, grazie alla loro capacità di modificare la superficie dei materiali migliorandone le proprietà bioattive e antimicrobiche.

Plasma a radiofrequenza con scarica luminosa (*radiofrequency glow discharge, rfGD*)

La scarica in radiofrequenza è una delle sorgenti di plasma più utilizzate nella modifica superficiale, grazie alla sua capacità di generare un plasma stabile su un ampio volume.

Le scariche in radiofrequenza si suddividono in due categorie, in base al metodo con cui la potenza in radiofrequenza viene accoppiata al carico: accoppiamento capacitivo o induttivo. Entrambi i metodi possono impiegare elettrodi interni o esterni. Tuttavia, nella modalità esterna viene utilizzata un tubo di scarica in vetro (quarzo o borosilicato) che permette di minimizzare effetti, quali contaminazione dovuta a impurezze introdotte nel plasma. Le caratteristiche operative del plasma rfGD sono riassunte nella seguente tabella [Tab. 3]⁶⁶.

Frequenza rfGD	13,56 MHz
Pressione durante la scarica	$10^{-3} - 10^2$ Torr
Densità elettronica a bassa pressione ($10^{-3} - 1$ Torr)	$10^9 - 10^{11} \text{ cm}^{-3}$
Densità elettronica a pressione media ($1 - 10^{-2}$ Torr)	Fino a 10^{12} cm^{-3}
Temperatura elettronica	Diversi eV
Temperatura ionica	Molto bassa

Tabella 3. Caratteristiche del plasma rfGD.

Plasma a risonanza di ciclotrone elettronico (ECR).

Un plasma ad alta densità può essere generato a bassa pressione utilizzando la risonanza ciclotronica elettronica (ECR). In questo tipo di sistema, le microonde vengono introdotte all'interno della camera del plasma attraverso una finestra di quarzo, mentre delle bobine magnetiche sono disposte attorno alla periferia della camera per creare le condizioni necessarie alla risonanza ciclotronica elettronica [Fig.23].

Quando un campo magnetico viene applicato al plasma, gli elettroni iniziano a ruotare in un'orbita elicoidale intorno alle linee del campo magnetico. La frequenza ciclotronica degli elettroni in assenza di un campo elettrico si definisce nel seguente modo:

$$\omega = \frac{eB}{m},$$

dove e e m rappresentano rispettivamente la carica e la massa dell'elettrone, mentre B è l'intensità del campo magnetico. Un plasma ad alta densità può essere in questo modo ottenuto regolando il campo magnetico in modo che la sua frequenza ciclotronica corrisponda alla frequenza delle microonde. L'aumento della densità del plasma è favorito dal trapping degli elettroni, che amplifica l'effetto ionizzante e aumenta la produzione di ioni. Di seguito, sono elencate alcuni dei parametri del plasma ECR [Tab. 4]⁶⁶.

Frequenza microonde	2,45 GHz
Pressione durante la scarica	$10^{-5} - 10^{-3}$ Torr
Densità elettronica	$10^{11} - 10^{12}$ cm^{-3}

Tabella 4. Caratteristiche del plasma ECR.

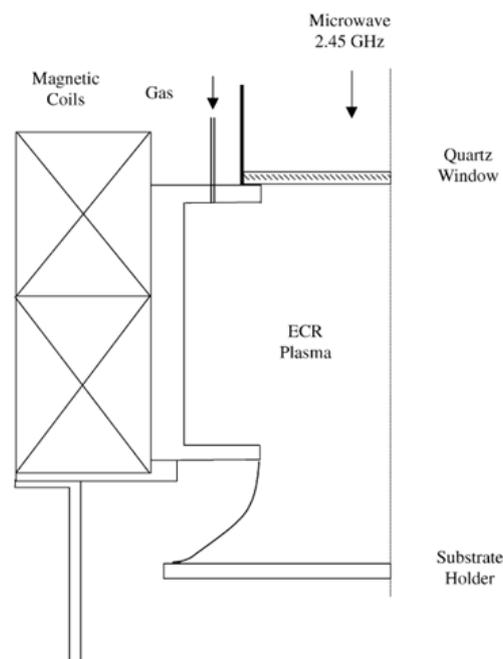


Figura 23. Schema di una sorgente al plasma ECR⁶⁶

Plasma a scarica effetto corona

La scarica a corona si presenta come un bagliore luminoso localizzato attorno alla punta di un elettrodo sottoposto a un campo elettrico altamente non uniforme. Quando l'anodo ha dimensioni ridotte rispetto al catodo, nelle vicinanze del primo si genera un campo elettrico molto intenso [Fig.24]. Se

catodo e anodo hanno dimensioni comparabili, l'applicazione della tensione genera una scintilla piuttosto che una scarica a corona. A causa dell'area ristretta in cui si sviluppa la scarica a corona punto-piano, le sue applicazioni nell'ambito della lavorazione dei materiali risultano piuttosto limitate, motivo per cui sono stati introdotti array bidimensionali di elettrodi per estendere l'area di trattamento⁶⁶.

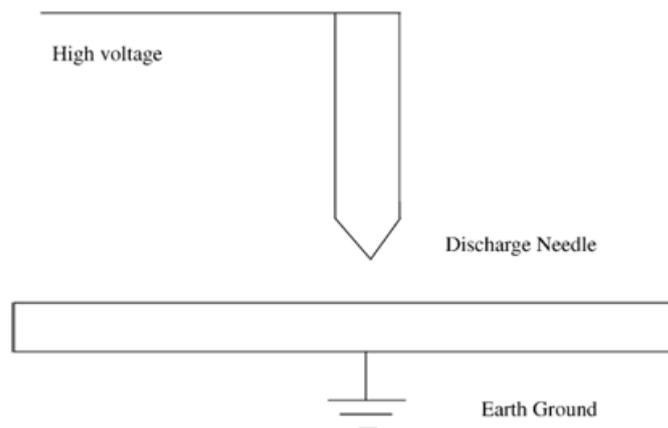


Figura 24. Schema di una sorgente al plasma a scarica effetto corona⁶⁶.

Pressione durante la scarica	760 Torr
Densità elettronica (zona corona)	$10^{13} - 10^9 \text{ cm}^{-3}$
Densità elettronica (zona di deriva)	10^6 cm^{-3}
Temperatura elettronica	5 eV
Temperatura ionica	Bassa

Tabella 5. Caratteristiche del plasma a scarica effetto corona.

Plasma atmosferico ad arco

La tipologia di plasma ad arco più utilizzata nell'ambito dei biomateriali è la torcia al plasma per spray coating. Una tipica configurazione di questo sistema prevede l'utilizzo di un anodo a forma di ugello, che funge da elemento di restrizione del flusso del plasma. Lo schema tradizionale di una torcia al plasma per spray coating prevede i seguenti elementi: un catodo a bastoncino con punta conica, un anodo esterno che funge anche da schermatura raffreddata ad acqua e messa a terra e degli ingressi per i gas utilizzato per generare il plasma [Fig.25]. Per mantenere attiva la torcia al plasma, è necessaria una corrente di scarica elevata e un'alta densità di potenza [Tab. 6]. Grazie all'elevata velocità del flusso di plasma e alle alte temperature di processo, quasi tutti le particelle solide introdotte nel

plasma vengono completamente fuse e accelerate verso il substrato con un'elevata velocità. Per questa serie di motivi, le torce al plasma atmosferico sono ampiamente utilizzate nel plasma spraying, una tecnica efficace per depositare rivestimenti ceramici, metallici e polimerici su superfici biomediche⁶⁶.

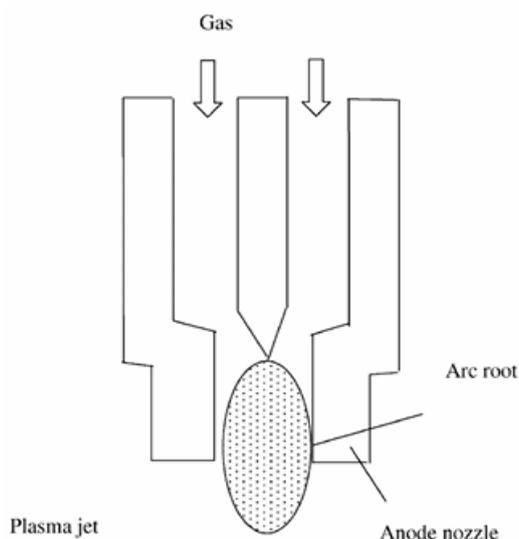


Figura 25. Schema di una sorgente di plasma atmosferico ad arco⁶⁶.

Pressione durante la scarica	760 Torr
Densità elettronica	$10^{16} - 10^{19} \text{ cm}^{-3}$
Temperatura elettronica	7-9 eV
Temperatura ionica	0,3-0.9 eV

Tabella 6. Caratteristiche di una sorgente di plasma atmosferico ad arco.

Plasma a pressione atmosferica DBD (dielectric barrier discharge)

Il plasma a pressione atmosferica con scarica a barriera dielettrica (DBD, Dielectric Barrier Discharge) è una tecnologia che permette la generazione di plasma in condizioni ambientali senza la necessità di camere a vuoto. Questo tipo di scarica si ottiene applicando una tensione alternata ad alta frequenza tra due elettrodi, uno dei quali è rivestito da un materiale dielettrico. Il dielettrico ha un ruolo fondamentale nel limitare la formazione di archi elettrici e nel migliorare l'omogeneità del plasma, garantendo una distribuzione più uniforme delle specie attive sulla superficie trattata. Il plasma DBD è particolarmente efficace per la modifica superficiale dei materiali, consentendo l'introduzione controllata di gruppi funzionali, migliorando proprietà come adesione, bagnabilità e reattività chimica. Grazie alla sua versatilità, questa tecnologia è ampiamente utilizzata in trattamenti di attivazione superficiale, deposizione di rivestimenti funzionali e sterilizzazione di materiali sensibili. Per l'applicazione di questa tecnologia, si possono utilizzare diversi tipi di reattore, tra cui quelli a piatti paralleli [Fig. 26 a]. Questi rappresentano una delle configurazioni più diffuse per il trattamento

omogeneo di superfici piane. Un'altra configurazione comune è quella cilindrica [Fig. 26 b], utilizzata in particolare per il trattamento di oggetti tridimensionali o tubolari⁶⁷.

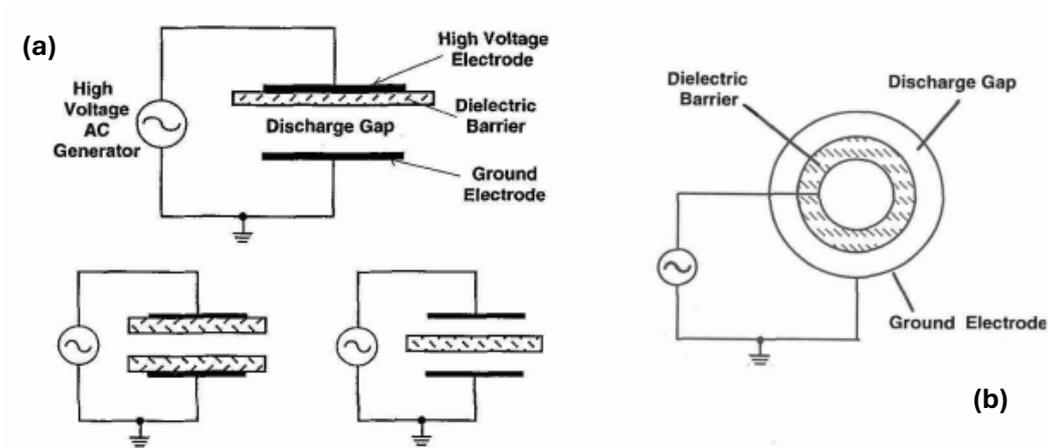


Figura 26. (a) Configurazione planare del DBD, (b) Configurazione cilindrica del DBD⁶⁷.

Plasma ad arco in vuoto

Una sorgente di plasma ad arco in vuoto è in genere composta da due parti principali: l'unità di produzione del plasma e un filtro per macro-particelle [Fig. 27]. Il plasma viene generato applicando un impulso ad alta tensione (diversi kV) all'elettrodo di innesco, provocando l'accensione di una scarica ad arco tra catodo e anodo. La corrente dell'arco si concentra sulla superficie del catodo, formando punti catodici altamente localizzati con una densità di corrente elevata [Tab. 7]⁶⁶, associata a sua volta ad una potenza locale estremamente alta che genera le condizioni per la trasformazione di fase del materiale solido del catodo in plasma completamente ionizzato. Il plasma prodotto nei punti catodici si espande rapidamente nel vuoto circostante. I punti catodici non sono solo la sorgente di plasma completamente ionizzato, ma generano anche delle macro-particelle che devono essere rimosse utilizzando dei filtri curvi. Uno dei principali vantaggi del processo ad arco catodico è la capacità di generare un elevato numero di ioni direttamente dal materiale catodico.

Pressione durante la scarica (spot catodico)	≈ 0 (Vuoto)
Densità elettronica	10^{20} cm^{-3}
Temperatura ionica	Tra 20 eV (elementi leggeri) e 200 eV (elementi pesanti)

Tabella 7. Caratteristiche del plasma ad arco in vuoto.

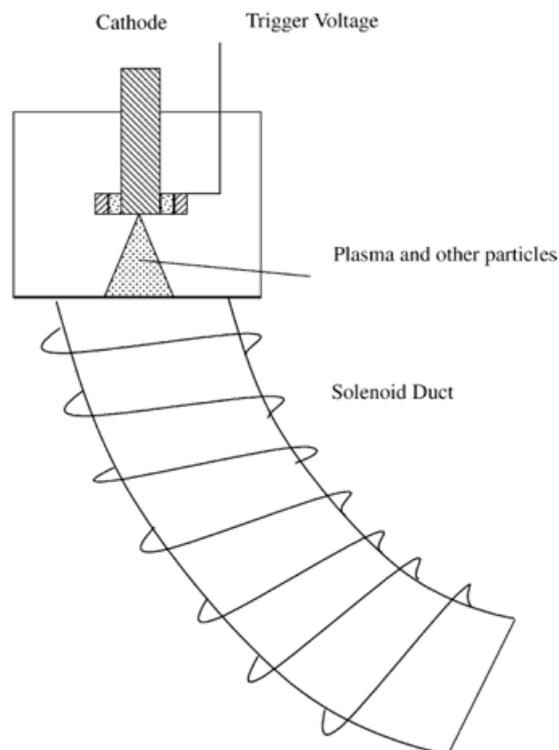


Figura 27. Schema di una sorgente di plasma ad arco in vuoto⁶⁶

Tecniche di modifica superficiale al plasma

Si procede con una panoramica delle tecniche maggiormente utilizzate per funzionalizzare le superfici dei materiali e conferire quindi particolari caratteristiche topografiche, morfologiche e chimiche.

Sputtering e etching al plasma

Lo *sputtering* al plasma e l'*etching* sono due tecniche fondamentali per il trattamento e la pulizia delle superfici dei materiali, in particolare nel campo dei biomateriali e delle superfici polimeriche. Lo *sputtering* è un processo fisico in cui ioni accelerati di argon colpiscono la superficie del materiale, rimuovendo progressivamente gli strati superficiali senza alterarne la struttura sottostante. È comunemente utilizzato per la pulizia preliminare delle superfici prima di trattamenti successivi quali impiantazione ionica e deposizioni al plasma. L'*etching* al plasma è invece una tecnica di degradazione superficiale utilizzata principalmente con i polimeri, può essere dominato da fenomeni di modifica superficiale o di degradazione, a seconda delle condizioni del plasma. Quando il plasma modifica il polimero, si verificano fenomeni di polimerizzazione o copolimerizzazione per innesto. Quando invece è predominante la degradazione, il plasma incide la superficie del polimero, rimuovendone gradualmente gli strati. L'efficacia dell'*etching* dipende dalla composizione chimica del polimero e dall'energia del plasma: polimeri con gruppi funzionali contenenti ossigeno sono più suscettibili, mentre polimeri privi di sostituenti (come le poliolefine) sono più resistenti. Tuttavia, la degradazione è

limitata agli strati superficiali, lasciando tutte le proprietà chimico fisiche del materiale intatte. Infine, oltre al meccanismo chimico di *etching*, nei polimeri si verifica spesso il fenomeno di *sputtering* fisico, in cui gli atomi superficiali vengono rimossi a causa dell'urto degli ioni del plasma. Questi processi combinati rendono le tecniche di *sputtering* e *etching* strumenti essenziali per il trattamento avanzato dei materiali^{66,68,69}.

Impianto ionico per immersione al plasma (PIII)

L'impianto ionico al plasma (PIII) è una tecnica avanzata per modificare le proprietà superficiali dei materiali, in particolare metalli e leghe, senza alterarne le proprietà strutturali. Il processo prevede che il materiale venga immerso in un plasma ad alta densità e sottoposto ad un potenziale negativo, che accelera gli ioni verso la superficie [Fig. 28]. Rispetto all'impianto ionico a fascio tradizionale, il PIII è un processo *non-line-of-sight*, ovvero gli ioni vengono accelerati in modo tale da avvolgere completamente il bersaglio. Ciò permette di trattare superfici complesse, poiché garantisce una modifica uniforme su tutta la superficie, migliorando proprietà come la resistenza alla corrosione, la durezza e la resistenza all'usura. Altro vantaggio chiave del PIII è la sua capacità di combinare impianto ionico, deposizione e incisione al plasma in un unico processo tramite la regolazione dei parametri operativi, senza la necessità di interrompere il vuoto. Il plasma necessario per il PIII può essere generato attraverso diverse configurazioni di reattori, tra cui rfGD o ECR per materiali polimerici o plasma ad arco in vuoto per introdurre elementi metallici sulle superfici di metalli e leghe.

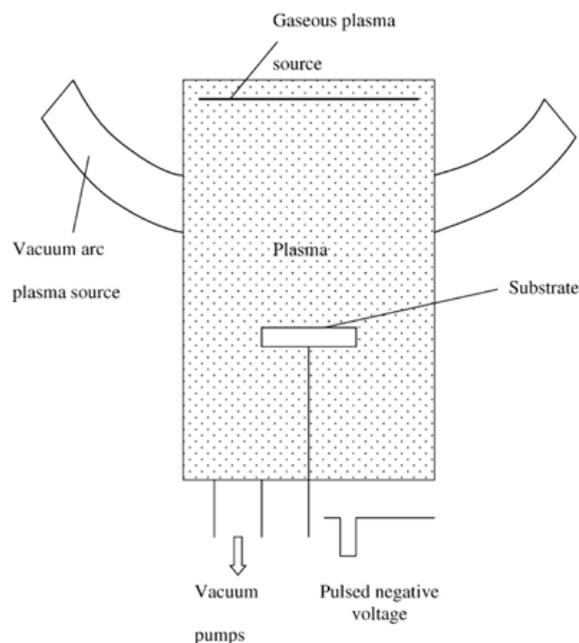


Figura 28. Schema del PIII⁶⁶.

Ulteriore vantaggio del PIII è la possibilità di combinare impianto ionico, deposizione e incisione al plasma in unico processo tramite la semplice regolazione dei parametri operativi, senza dover

interrompere il vuoto. Inoltre, poiché il trattamento avviene a bassa temperatura, il rischio di deformazione termica è ridotto al minimo, rendendo il processo ideale per i materiali sensibili al calore. Tuttavia, affinché la dose ionica sia distribuita in modo uniforme sull'intera superficie, è necessaria un'attenta ottimizzazione dei parametri di processo, quali densità del plasma, durata degli impulsi e tensione applicata. Per migliorare l'efficienza del trattamento e prevedere il comportamento degli ioni nel plasma, vengono spesso utilizzate simulazioni numeriche basate su modelli *Particle-in-Cell* (PIC) e modelli fluidodinamici, che consentono di perfezionare le condizioni operative e garantire risultati riproducibili^{66,70,71}.

Tale processo può essere infine implementato anche in materiali polimerici, modificandone le proprietà superficiali per migliorarne la biocompatibilità, l'adesione e le interazioni con i fluidi biologici. Il processo avviene attraverso la rimozione dell'idrogeno delle catene polimeriche, generando radicali liberi che successivamente si combinano con i radicali semplici creati dal plasma per formare gruppi funzionali contenenti ossigeno o azoto. I polimeri sono generalmente idrofobici, ma il trattamento al plasma ad ossigeno o con altri gas quali biossido di carbonio (CO_2), monossido di carbonio (CO), biossido di azoto (NO_2) e ossido nitrico (NO), migliora le proprietà idrofile poiché viene favorita l'introduzione di gruppi ossigenati sulla superficie del materiale. Oltre ai gruppi ossigenati, si possono formare gruppi funzionali contenenti cloro, che aumentano ulteriormente l'idrofilicità, utilizzando plasma a base di $CFCl_2$ e CCl_4 . D'altra parte, se l'obiettivo è incrementare le proprietà idrofobiche del materiale, è possibile utilizzare plasmi ad alta fluorurazione (SF_6 , CF_4 , C_2F_6) che conferiscono alla superficie del polimero una maggiore repellenza all'acqua^{66,72}.

Deposizione al plasma (*plasma deposition*)

La deposizione al plasma è una tecnica che consente la creazione di film sottili con proprietà chimiche, fisiche e meccaniche diverse rispetto al materiale di base. Si prosegue adesso con l'elenco di alcune delle tipologie di tecniche più utilizzate, tra cui la deposizione al plasma duale, la copolimerizzazione per innesto al plasma, la polimerizzazione a plasma, l'ablazione laser e il plasma *spraying*.

Deposizione al plasma duale

La deposizione al plasma duale è un metodo avanzato derivato dall'impianto ionico per immersione al plasma (PIII), in cui vengono simultaneamente generati un plasma gassoso e un plasma metallico, rispettivamente tramite rfGD e plasma ad arco in vuoto. Quest'approccio permette la creazione di film sottili composti da più elementi (gas e metalli) all'interno della stessa camera, senza interrompere il vuoto. Alcuni dei vantaggi significativi di questa tecnica includono il fatto che la sorgente a plasma ad arco in vuoto opera in modalità pulsata, garantendo una elevata densità ionica e favorendo una nucleazione ad alta densità sulla superficie del substrato. Inoltre, durante gli intervalli di tempo tra un

impulso e l'altro, gli atomi adsorbiti hanno il tempo di diffondersi e stabilizzarsi, migliorando la qualità finale del *coating* depositato. Un altro aspetto fondamentale della deposizione al plasma duale è la possibilità di realizzare rivestimenti uniformi su superfici di grandi dimensioni. L'energia degli ioni può essere regolata applicando una tensione continua nel caso di substrati conduttivi o semiconduttori, mentre per materiali isolanti è necessario applicare una tensione alternata o pulsata per evitare l'accumulo di cariche. Questa tecnica è stata utilizzata con successo nella sintesi di film sottili di TiN e TiO_2 , combinando le tecniche di plasma ad arco in vuoto con catodo in titanio e plasma di azoto in radiofrequenza per la deposizione di TiN mentre, per ottenere TiO_2 , il flusso di azoto viene interrotto e si introduce ossigeno nella camera a vuoto. Controllando poi il flusso dei due gas, è possibile regolare la composizione del film ottenuto^{66,73}.

Polimerizzazione al plasma

La polimerizzazione al plasma consente la trasformazione di monomeri a basso peso molecolare in polimeri ad alto peso molecolare, grazie all'azione delle specie energetiche presenti nel plasma, come elettroni, ioni e radicali liberi. A differenza della polimerizzazione convenzionale, il processo al plasma genera polimeri con composizione chimica e proprietà fisiche uniche, spesso diverse da quelle ottenute con i metodi tradizionali. I passaggi principali della reazione comprendono attivazione dei monomeri al plasma, formazione dei radicali liberi e ricombinazione delle unità polimeriche. Il risultato è una struttura polimerica complessa e reticolata, con elevato modulo elastico e assenza di temperatura di transizione vetrosa. La polimerizzazione al plasma può essere usata per creare film con proprietà specifiche, quali film di carbonio idrogenato (CH_x), polimeri idrofobici realizzati con gas fluorurati (fluoruro di idrogeno, trifluoruro di azoto o trifluoruro di bromo) e polimeri organosiliconici (silano, disilossano)⁶⁶.

Copolimerizzazione al plasma

Quando i polimeri vengono esposti ad un plasma, si generano radicali liberi sulla superficie del materiale che possono innescare reazioni di polimerizzazione a contatto con monomeri in fase liquida o gassosa. Questo porta alla formazione di copolimeri innestati sulla superficie del materiale. La copolimerizzazione per innesto al plasma viene spesso impiegata per modificare le proprietà idrofiliche delle superfici polimeriche. Il polimero viene generalmente esposto a un plasma di argon, elio o azoto per pochi secondi, introducendo un'elevata densità di radicali sulla superficie. Tali radicali possono rimanere attivi per giorni, quando il polimero viene esposto a monomeri in fase vapore ad alta temperatura, viene favorita la reazione di innesto. Tuttavia, bisogna prestare attenzione alla presenza di ossigeno nel monomero in fase di vapore, in quanto potrebbe inibire la reazione^{66,74-76}.

Ablazione laser (LA)

L'ablazione laser è una tecnica di deposizione avanzata in cui un impulso laser ad alta energia vaporizza il materiale dalla superficie al bersaglio, generando un plasma che trasporta le particelle fino al substrato, formando così un film sottile. La qualità del film dipende dalla densità e dall'energia cinetica del plasma, in quanto un'energia controllata (*fluence laser* ottimale pari a circa $1,5 \text{ J/cm}^2$ per impulso) garantisce una distribuzione uniforme del *coating* depositato. Per ottenere film di alta qualità, è fondamentale regolare parametri quali la distanza substrato-bersaglio (da 2 a 5 cm) e la pressione del gas ambiente. L'ablazione laser consente la deposizione di materiali con elevato punto di fusione, senza contaminare il film con residui da riscaldamento come nei processi convenzionali. Può essere utilizzata anche in ambienti ossidanti ad alta pressione in quanto non richiede l'uso di un filamento o sistemi di riscaldamento. Tuttavia, uno svantaggio comune del presente processo è la formazione di goccioline submicrometriche sulla superficie del film, le quali possono influenzarne l'omogeneità⁶⁶.

Plasma spraying

Il plasma spraying a pressione atmosferica è una tecnica avanzata di deposizione, in cui le polveri del materiale da depositare vengono fuse completamente o parzialmente, all'interno di un plasma ad elevata temperatura, generato da una torcia. Una volta riscaldate, queste particelle vengono accelerate ad alta velocità verso il substrato su cui formano un rivestimento con struttura lamellare [Fig.29].

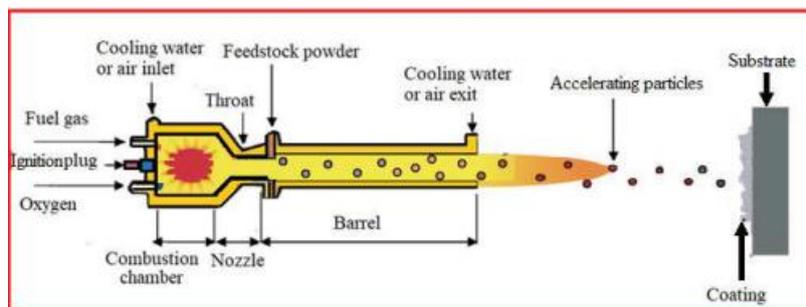


Figura 29. Diagramma semplificato del meccanismo di funzionamento della torcia al plasma⁷⁷.

L'elemento chiave del plasma spraying è la creazione di un getto di plasma ad elevata temperatura, generato all'interno della torcia costituita da un catodo in tungsteno con geometria conica e un anodo cilindrico in rame [Fig. 30]. Un flusso di gas (argon, elio, idrogeno o azoto) scorre tra i due elettrodi e, grazie ad una scarica ad alta frequenza, viene innescato un arco elettrico che allunga il plasma fino all'uscita della torcia, formando una fiamma di plasma con temperature comprese tra 10000 e 15000 °C. Grazie alle temperature estremamente elevate, questa tecnica consente di depositare qualsiasi tipo di metallo o in genere materiali con un elevato punto di fusione, quali ceramiche, cermet e materiali refrattari. Condizione necessaria affinché si possa depositare il materiale è che questo abbia una temperatura di fusione inferiore di almeno 300 K rispetto alla sua temperatura di decomposizione o evaporazione. La velocità finale e la temperatura delle particelle dipendono dal tipo di gas di plasma

utilizzato. Le polveri impiegate per la spruzzatura hanno generalmente un diametro compreso tra 10 e 100 μm , dimensione ottimale per ottenere un'accelerazione adeguata e un riscaldamento uniforme. Al fine di ottenere un rivestimento omogeneo e di alta qualità, è essenziale mantenere un flusso costante delle polveri (PFR) e garantire un'ottima fluidità delle particelle, proprietà dipendente dalla loro morfologia e dimensione. Il rivestimento finale ottenuto con il plasma *spraying* è caratterizzato da una struttura stratificata. Tuttavia, l'ottimizzazione dei parametri di processo è complessa e costosa, in quanto coinvolge numerosi fattori operativi e relazioni interdipendenti tra di essi.

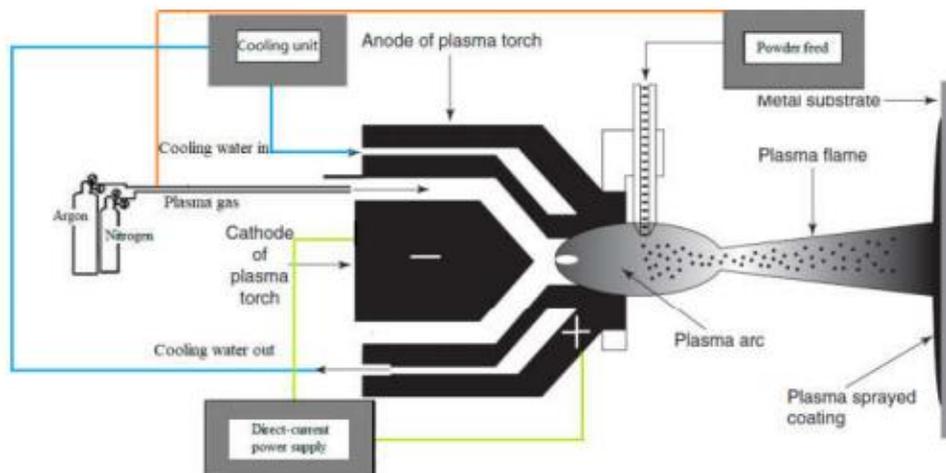


Figura 30. Set-up semplificato della tecnica del plasma-spray⁷⁷.

Nonostante questa sia una tecnologia molto versatile, presenta alcuni svantaggi significativi, tra cui la decomposizione della bioceramica a causa delle elevate temperature raggiunte, le elevate tensioni termiche residue che potrebbero compromettere l'adesione del rivestimento, la presenza di difetti strutturali che possono ridurre la qualità e la durata del rivestimento.

Il plasma *spraying* rappresenta una delle tecniche più utilizzate per la deposizione di rivestimenti in idrossiapatite, in quanto favorisce l'osteointegrazione e migliora la biocompatibilità degli impianti metallici. Tuttavia, a causa della sua fragilità, sono stati sviluppati dei coating compositi per combinare l'HAp con materiali quali ossido di titanio (TiO_2), ossido di alluminio (Al_2O_3) e ossido di zirconia. Alcuni studi hanno inoltre dimostrato che l'impiego di strati intermedi in titanio puro migliora l'adesione del rivestimento all'impianto e riduce le tensioni residue. Inoltre, i rivestimenti di HA arricchiti con ioni magnesio e stronzio, mostrano un'elevata attività biologica, promuovendo la crescita cellulare e la formazione di matrice extracellulare. Un'ulteriore innovazione è rappresentata dalla realizzazione di rivestimenti a doppio strato $Ha/Al_2O_3-SiO_2$ che migliorano la rugosità, la bagnabilità e la proliferazione cellulare rispetto ai rivestimenti monostrato. Inoltre, l'utilizzo combinato di plasma *spraying* e ablazione laser ha permesso di ottenere rivestimenti funzionali con proprietà antibatteriche e migliori prestazioni meccaniche^{66,77}.

Effetti della modifica superficiale tramite plasma

Nella maggior parte delle applicazioni, è fondamentale che la modifica superficiale al plasma non alteri in maniera significativa le proprietà intrinseche del materiale. L'obiettivo ideale sarebbe quello di intervenire sullo strato molecolare più esterno (0,33 – 1 nm). Tuttavia, nella pratica, è necessario un film più spesso per garantire una copertura uniforme, priva di difetti e resistente a fenomeni di degradazione meccanica e inversione superficiale. Il processo di modifica al plasma dovrebbe produrre un film con spessore minimo, garantendo al contempo l'uniformità, la durabilità e le funzionalità richieste. La realizzazione di un film di spessore ottimale comporta numerose sfide tecniche, tra cui il controllo preciso del processo di deposizione e la scelta di materiali compatibili con il substrato da un punto di vista sia chimico che meccanico.

Morfologia superficiale

La topografia superficiale degli scaffold per la crescita cellulare influisce direttamente sul comportamento e sulle funzioni delle cellule. Tra le tecniche di modifica superficiale, il plasma *etching* consente la rimozione selettiva di materiale tramite reazioni con specie attive del plasma, permettendo la creazione di micro e *nano-pattern* che migliorano la biocompatibilità in vivo. Il *micro-patterning* chimico assistito dal plasma, ad esempio, è utilizzato per miniaturizzare le strutture dei supporti per la coltura cellulare. Con l'impiego di maschere a rete elettroformata, è possibile trasferire *pattern* controllati rimuovendo selettivamente gli atomi dalle aree non coperte. In questo modo è possibile trasferire *pattern* controllati rimuovendo selettivamente gli atomi dalle aree non coperte.

È stato inoltre visto che i biomateriali modificati su scala microscopica regolano funzioni cellulari essenziali, quali proliferazione, differenziazione e apoptosi. Uno studio di Ito et al. ha dimostrato che un *micro-pattern* di eparina immobilizzata tramite fotolitografia attiva il fattore di crescita dei fibroblasti, promuovendo la crescita cellulare⁷⁸.

Nel caso di metalli e ceramiche, il trattamento al plasma ha portato alla formazione di superfici con maggiore rugosità e altamente bioattive, favorendo ad esempio l'adesione di cellule osteoblastiche e la crescita di nuovo tessuto osseo intorno agli impianti. Ad esempio, il plasma *etching* su titanio commercialmente puro ha permesso di ottenere rugosità con ampiezza compresa tra 1 e 10 μm . Coltivando poi fibroblasti dermici di ratto su questi supporti, si è osservato come le cellule rispondessero in maniera diversa in base alla topografia superficiale, confermando che le dimensioni della microstruttura influenzano direttamente l'adesione e l'orientamento cellulare⁷⁹.

Un effetto simile è stato osservato anche su substrati polimerici quali la gomma siliconica o il PEEK. In quest'ultimo caso, il materiale veniva trattato con plasma ad ossigeno, in modo che la superficie subisse una modifica della topografia, con un aumento della rugosità e della quantità di gruppi

funzionali ossigenati. Questi cambiamenti hanno portato ad un incremento dell'energia superficiale e della bagnabilità, facilitando l'adesione cellulare e migliorando la bagnabilità del materiale⁸⁰.

L'importanza di queste modifiche risiede non solo nel miglioramento delle proprietà meccaniche e chimiche del materiale, ma anche nella possibilità di ottimizzare l'interazione con l'ambiente biologico senza compromettere l'integrità strutturale del substrato⁶⁶.

Effetti del trattamento al plasma su materiali per dispositivi ortopedici

Il trattamento al plasma ha avuto un impatto significativo sulle prestazioni dei materiali utilizzati nei dispositivi ortopedici, in particolare sulle leghe a memoria di forma in nichel-titanio (NiTi) e sulle leghe di titanio, migliorandone la biocompatibilità, la resistenza alla corrosione e l'osteointegrazione.

Le leghe NiTi sono impiegate in ortopedia per la loro superelasticità e la capacità di ritorno alla forma originale, rendendole ideali per dispositivi come i fili di fissazione spinale e le protesi articolari. Tuttavia, presentano un'importante limitazione, ovvero il rilascio di ioni nichel che può portare a reazioni allergiche e citotossicità in pazienti sensibili. Per risolvere questo problema, è stato tentato un trattamento di PIII che ha portato alla formazione di barriere superficiali protettive, costituite da composti del titanio (TiC, TiN o TiO). Tali barriere hanno dimostrato di impedire la diffusione del nichel, migliorando così la sicurezza dell'impianto.

Il titanio e le sue leghe hanno invece beneficiato del trattamento al plasma nel caso in cui questo prevedesse l'impianto di ioni calcio, migliorando la capacità osteointegrativa del materiale, favorendo la formazione di uno strato di idrossiapatite sulla superficie del materiale⁸¹.

Effetto del trattamento al plasma su materiali per dispositivi cardiovascolari

Nel campo dei materiali cardiovascolari, il trattamento al plasma è impiegato principalmente per migliorare la compatibilità ematica dei materiali utilizzati per valvole cardiache artificiali, *stent* e superfici dei *bypass* vascolari. Uno dei materiali più promettenti in questo tipo di applicazioni è il DLC (*Diamond-Like Carbon*), noto per la sua inerzia chimica, la resistenza all'usura e il basso coefficiente di attrito. Uno dei suoi principali limiti rimane il rischio di attivazione della coagulazione del sangue con la conseguente formazione di trombi sulla superficie del materiale. Metodi che hanno visto la riduzione di questo fenomeno sono stati trattamenti basati sul drogaggio con azoto e fosforo effettuati mediante impianto ionico al plasma, oppure con il solo fosforo. Quest'ultimo metodo ha permesso di ridurre l'adesione delle piastrine migliorando la bagnabilità superficiale del materiale stesso⁸².

Effetto del trattamento al plasma su materiali in ambito dentale

Alcuni studi hanno invece dimostrato come trattamenti al plasma atmosferico a bassa temperatura ottimizzino l'osteointegrazione degli impianti dentali e l'adesione nei restauri, oltre a conferire proprietà antibatteriche.

Nel caso di impianti dentali in titanio e zirconia, il trattamento al plasma ha aumentato la bagnabilità e l'energia superficiale, riducendo l'angolo di contatto e favorendo l'adesione degli osteoblasti. È stato poi dimostrato che il plasma ad ossigeno e argon modifica anche a chimica superficiale della zirconia, aumentando la presenza di gruppi idrossilici (-OH) che migliorano l'interazione con le proteine plasmatiche, stimolando il differenziamento osseo.

Per quanto riguarda i restauri dentali in ceramica e zirconia, il trattamento al plasma ha invece migliorato la qualità dell'adesione ai cementi resinosi, evitando l'impiego di acidi aggressivi. L'applicazione del plasma atmosferico ha inoltre favorito la formazione di gruppi funzionali alla superficie della ceramica, aumentando l'energia superficiale e migliorando la resistenza del legame adesivo. Per quanto riguarda la zirconia, il trattamento mediante fluorurazione al plasma ne ha incrementato la reattività chimica, rendendola più compatibile con gli adesivi dentali.

Altro aspetto particolarmente importante riguarda le proprietà antimicrobiche conferite dal plasma, il quale può essere anche applicato nell'ambito della decontaminazione degli impianti e nella disinfezione canalare in endodonzia. Il plasma a freddo a pressione atmosferica ha dimostrato di ridurre significativamente la carica batterica su superfici dentali infette, eliminando microrganismi quali *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*, senza danneggiare i tessuti biologici. Gli studi in questione hanno evidenziato che l'uso di plasma di ossigeno, argon e azoto genera delle specie reattive all'ossigeno (ROS) e all'azoto che ossidano e degradano la matrice polimerica che compone il biofilm. Questo processo porta alla distruzione della struttura protettiva dello stesso, riducendo la capacità dei batteri di aderire nuovamente alla superficie⁸³.

Sezione Sperimentale

Il presente lavoro di tesi propone la realizzazione di un coating di chitosano tramite funzionalizzazione superficiale al plasma su materiali quali vetri bioattivi (S53P4 e SBA2) e materiali ceramici (idrossiapatite e zirconia stabilizzata con ittria). L'obiettivo principale è quello di riuscire a depositare un rivestimento di chitosano uniforme e omogeneo, in grado di conferire proprietà antibatteriche e favorire l'osteointegrazione dei materiali inerti. I campioni di vetro bioattivo e i pellets ceramici sono stati realizzati in laboratorio, le funzionalizzazioni sono state svolte presso la sede di IRIS s.r.l.

Materiali e metodi

Si è lavorato con due tipologie di materiali, vetri bioattivi (S53P4 e SBA2) e materiali ceramici (HAp e YSZ) prodotti presso il Dipartimento di Scienze Applicate e Tecnologia del politecnico di Torino nei mesi da ottobre 2024 a marzo 2025, con l'intento di rendere antibatteriche le superfici dei materiali impiegati per la realizzazione dei sostitutivi ossei o viti dentali, in modo da ridurre il rischio di infezione dopo l'impianto, evitando di intaccare le proprietà osteointegrative dei materiali stessi.

Vetri bioattivi

Sono state utilizzate due tipologie di vetri bioattivi: S53P4, commercialmente noto come BoneAlive®, e SBA2, vetro bioattivo non commerciale con composizione ideata dal gruppo di ricerca del DISAT. Si tratta in entrambi i casi di materiali appartenenti alla classe di vetri a base di silice di Hench che presentano composizioni differenti [Tab.8].

	%wt per SBA2	%wt per S53P4
<i>SiO₂</i>	46,53	53
<i>Na₂O</i>	18,02	23
<i>CaO</i>	27,14	20
<i>P₂O₅</i>	6,88	4
<i>B₂O₃</i>	0,48	-
<i>Al₂O₃</i>	0,94	-

Tabella 8. Frazione in peso dei componenti dei vetri bioattivi.

La produzione dei vetri bioattivi vede come primo step la miscelazione delle polveri dei reagenti, le cui quantità in peso sono indicate nelle seguenti tabelle [Tab. 9] [Tab. 10]. La differenza principale tra le due tipologie di vetro bioattivo è costituita dalla presenza di acido borico (H_3BO_3) e allumina (Al_2O_3) che non sono presenti nella composizione del BoneAlive®. Una volta individuati i reagenti, si procede con la pesata delle polveri sotto cappa chimica. Successivamente, le polveri vengono poste su rulli rotanti e lasciate a miscelare per ventiquattro ore circa. In seguito, si procede con le fasi di fusione e colata.

Reagenti	Peso [g]
SiO_2	46,53
Na_2CO_3	30,82
$CaCO_3$	33,92
$Ca_3(PO_4)_2$	15,02
H_3BO_3	0,43
Al_2BO_3	0,94

Tabella 9. Peso dei reagenti per la sintesi dello SBA2.

Le polveri miscelate vengono in seguito versate in un crogiolo di platino che va inserito in forno (Nabertherm® LHT 04/18). In seguito, il fuso risultante viene colato in uno stampo cilindrico in ottone che verrà posto in un secondo forno (Manfredi® OVMAT 2009) per la fase di *annealing*. Le due tipologie di vetri bioattivi, avendo diverse caratteristiche, sono sottoposte a differenti trattamenti termici.

Per quanto riguarda il vetro SBA2, questo viene inserito a freddo nel forno di colata raggiungendo una temperatura pari a 1450°C, con un *dwell time* pari ad un'ora. Il fuso ottenuto viene poi colato nello stampo preriscaldato e sottoposto alla fase di tempra nel forno di *annealing* a 500°C per tredici ore.

Le polveri del vetro S53P4 vengono invece portate da fredde a fusione nel primo forno ad una temperatura di 1360°C per tre ore. Il vetro viene successivamente colato e poi ricotto a 1520°C per un'ora.

Una volta ottenute le barrette di ciascun tipo di vetro, si può procedere con la fase di taglio al fine di ottenere dei campioni della grandezza desiderata. Nel dettaglio, è stata utilizzata la troncatrice (Buehler® IsoMet High Speed Pro) dotata di lama diamantata, al fine di ottenere dei campioni di forma cilindrica con diametro pari a 10 mm e altezza di 4 mm.

Una volta ottenuti i campioni, si procede con la lucidatura di una delle due superfici circolari, utilizzando un'apposita lucidatrice (Struers® LaboPol-2). In particolar modo, è stata impostata una velocità di rotazione pari a 500 rpm ed è stato seguito uno specifico protocollo, secondo cui sono stati alternati diversi tipi di carta abrasiva nel seguente ordine: sgrossatura iniziale (per rimuovere eventuali gradini residui dal processo di taglio) con carta P600, segue una P800 per 30s, P1000 per 60s, P1200 per 90s, P2500 per 120s e P4000 per 150s, al fine di ottenere una superficie macroscopicamente liscia.

Materiali ceramici

I ceramici utilizzati in questo studio sono idrossiapatite (HAp) e zirconia parzialmente stabilizzata con ittria (YSZ). Per la realizzazione dei pellet, si parte in entrambi i casi dalla miscelazione delle polveri.

Il campione in idrossiapatite viene realizzato a partire dalle polveri nanometriche di HAp miscelate con acido stearico in qualità di collante. Per produrre un pellet di HAp si pesano circa 800 mg di polveri a cui si aggiunge il 2% in peso di acido stearico macinato e setacciato con una maglia da 100 µm,

Reagenti	Peso
SiO_2	53
Na_2CO_3	39,32
$CaCO_3$	27,27
$Ca_3(PO_4)_2$	8,73

Tabella 10. Peso dei reagenti per la sintesi di S53P4.

arrivando ad un totale di 816 mg. Una volta pesate le polveri, lo step successivo è la compattazione che, in questo caso, avviene inserendo le polveri in un pellettizzatore (Specac® Atlas Evacuabile Pellet Dies) con diametro di 13 mm, posto in seguito all'interno di una pressa meccanica (Graseby Specac® T-40 Autopress). Si imposta quindi una forza pari a quattro tonnellate agente sul campione per 20s. I pellet ottenuti vengono in seguito posti in forno (Nabertherm® 1300 new) per il processo di sinterizzazione, la cui durata si aggira intorno alle 13 ore, seguendo un protocollo termico:

- Riscaldamento da 20°C a 700°C con *heating rate* di 2°C/min;
- Riscaldamento da 700°C a 1250°C con *heating rate* di 5°C/min;
- Mantenimento per 180 min a 1250°C;
- Raffreddamento da 1250°C a 20°C con *cooling rate* di 10°C/min.

Una volta raffreddati, i campioni vengono lucidati seguendo il protocollo descritto precedentemente.

Per quanto riguarda i pellet di zirconia, ciascuno di essi è stato realizzato a partire dalla pesatura delle polveri, utilizzando 1,2 g di YSZ. Anche in questo caso, le polveri sono state poste all'interno dello stesso tipo di pellettizzatore usato per l'apatite e poi compattate tramite pressa idraulica (P400ir), applicando una forza di circa 100 MPa sempre per 20s. I campioni ottenuti sono stati poi inseriti nel forno (Nabertherm® 1300 new) per la fase di sinterizzazione, sottoponendoli ad un ciclo termico dalla durata di circa 10 ore:

- Riscaldamento da 20°C a 900°C con *heating rate* di 10°C/min;
- *Dwell time* di 30 min a 900°C;
- Riscaldamento da 900°C a 1500°C con *heating rate* di 3°C/min;
- Mantenimento per 120 min a 1500°C;
- Raffreddamento da 1500°C a 20°C con *cooling rate* di 10°C/min.

Una volta raffreddati, i pellets sono sempre lucidati secondo il protocollo già definito.

Funzionalizzazioni al plasma

Le funzionalizzazioni al plasma sono state condotte sulla superficie lucidata dei campioni levigati a grana P4000. Il processo di modifica al plasma si suddivide sostanzialmente in due fasi: una fase preliminare, finalizzata all'attivazione dei gruppi funzionali presenti sulla superficie dei campioni e la fase successiva di trattamento in cui avviene la deposizione del coating.

Pretrattamento dei campioni

La fase di pretrattamento è avvenuta utilizzando un reattore al plasma in configurazione DBD (*dielectric barrier discharge*, anche noto come reattore "a piatti paralleli"), a disposizione presso IRIS S.r.l. Nel dettaglio, sono state selezionate e implementate diverse strategie di pretrattamento mirate a migliorare

la reattività superficiale dei materiali. In particolare, la scelta dei parametri è stata guidata dalla necessità di massimizzare l'introduzione di gruppi funzionali senza comprometterne l'integrità strutturale, con particolare attenzione ai ceramici in quanto bioinerti.

Il pretrattamento al plasma è stato eseguito con l'obiettivo di rendere le superfici del biomateriale idonee ai successivi trattamenti di coating. A tal proposito, sono stati adottati quattro diversi tipi di pretrattamento, mirati a introdurre specifiche funzionalizzazioni superficiali. In particolare, due pretrattamenti sono stati utilizzati per l'inserimento controllato di gruppi carbossilici (-COOH): il primo impiegando plasma atmosferico con gas reattivo (Ar e CO_2 , Pretrattamento 1) e il secondo tramite deposizione di un monomero in fase liquida (acido acrilico, Pretrattamento 2). Un terzo pretrattamento (Pretrattamento 3) è stato invece realizzato per introdurre gruppi ossidrilici (-OH), favorendo ulteriormente l'adesione e l'interazione con i rivestimenti successivi. Un ultimo pretrattamento (Pretrattamento 4) è stato infine effettuato con l'obiettivo di aumentare la reattività dei materiali ceramici, aumentando il valore di parametri del plasma. Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in condizioni operative studiate per garantire un'efficace modifica superficiale, evitando di alterare l'integrità strutturale del biomateriale.

	Flusso di gas (l/min)					Condizioni plasma			
	Acido acrilico (<i>bubbler</i>)	SANARC C18	He	Ar	O_2	Tensione (kV)	Frequenza (kHz)	Tempo (s)	Temperatura (°C)
1	/	6	/	/	/	6	5	90/60	20
2	1,5	/	/	5	/	6	5	60	110
3	/	/	/	7	0,6	6	5	60 x 10 cicli	20
4	1,5	/	/	5	/	12	12	60	110

Tabella 11. Parametri del pretrattamento al plasma.

Pretrattamento 1

In un primo momento, è stata utilizzata una miscela nota come SANARC C18, composta da Argon per l'82% e anidride carbonica per il restante 18%, cercando di favorire l'attivazione superficiale dei campioni mediante un trattamento a freddo, in quanto la temperatura impostata non supera i 20°C, come si evince dalla tabella [Tab.11].

Pretrattamento 2

Il secondo tipo di pretrattamento prevedeva l'utilizzo di una soluzione di acido acrilico al 10% e acido acetico in un *bubbler* e somministrazione della stessa nella camera di reazione mediante l'utilizzo di Argon (gas inerte che serve a fare lo stripping del liquido), secondo i parametri descritti sopra [Tab.11]. Tutti i materiali sono sottoposti al pretrattamento per un periodo di 60s. Il trattamento in questo caso è

a caldo, ovvero la temperatura della camera del plasma è stata aumentata fino a 110°C in modo da ottenere il monomero in forma gassosa.

Pretrattamento 3

Questo tipo di pretrattamento è stato ideato principalmente per la zirconia, come suggerito nello studio di Hodàsova et al.⁸⁴ e prevede 10 cicli di trattamento dalla durata di 50s ciascuno, utilizzando plasma atmosferico, con un flusso di argon e ossigeno a temperatura ambiente [Tab.11].

Pretrattamento 4

Nel'ultimo caso si procede, come visto in precedenza, con la somministrazione di acido acrilico mediante *bubbler*. L'unica differenza è che, in questa modalità, la zirconia è stata pretrattata modificando i parametri di voltaggio e tensione del plasma, i quali vengono rispettivamente aumentati a 12 kV e 12 kHz.

Una volta effettuato il pretrattamento, si procede con la deposizione del chitosano.

Trattamento dei campioni

Reattore al plasma a piatti paralleli

La prima parte dei trattamenti è stata condotta utilizzando la configurazione DBD del reattore, impostando i parametri proposti nella tabella sottostante [Tab.12]. Inizialmente, è stata preparata una soluzione di chitosano allo 0,5% (m/v) dissolvendo 0,1 g di chitosano in polvere in 20 mL di soluzione acquosa di acido acetico al 2%, seguita da agitazione a temperatura ambiente per 24 ore. Successivamente, la soluzione è stata diluita due volte con acqua deionizzata (DI), fino a raggiungere una concentrazione dello 0,25%, al fine di generare una soluzione aerosol stabile per favorire una deposizione continua al plasma. Si procede poi con il riscaldamento del chitosano in soluzione (0,25%) tramite agitatore e si utilizza la pompa peristaltica [Fig.31 b] per condurre il chitosano in miscela alla camera di reazione. Inizialmente, il collegamento con la pompa avviene sulla porzione laterale della camera di reazione [Fig.31 a]: questo comporta una deposizione di coating non uniforme poiché si verifica un gocciolamento laterale della soluzione sulla base di allumina, proveniente direttamente dalla campana. L'analisi del comportamento della pompa peristaltica ha poi evidenziato difficoltà nel controllo preciso del flusso per piccole quantità di soluzione chimica, portando a oscillazioni tra valori di minimo e massimo, causando così il fenomeno di gocciolamento.

In una prima fase, il tempo di permanenza all'interno della camera di reazione si aggirava intorno al minuto ma, specialmente per i materiali inerti, si è pensato di raddoppiare la durata del trattamento. Ulteriore complicanza riguardava l'elevata intensità delle correnti generate durante il processo (125-135 mA) che hanno provocato un innalzamento della temperatura della camera di reazione.

	Flusso di gas (l/min)			Condizioni plasma				
	Flusso soluzione chitosano (L/min)	He	Ar	O ₂	Tensione (kV)	Frequenza (kHz)	Tempo (s)	Temperatura (°C)
1	0,4/0,8	7	/	/	12	12	60	130
2	0,4/0,8	7	/	/	12	12	60/120	130

Tabella 12. Parametri del plasma per la fase di deposizione del chitosano.

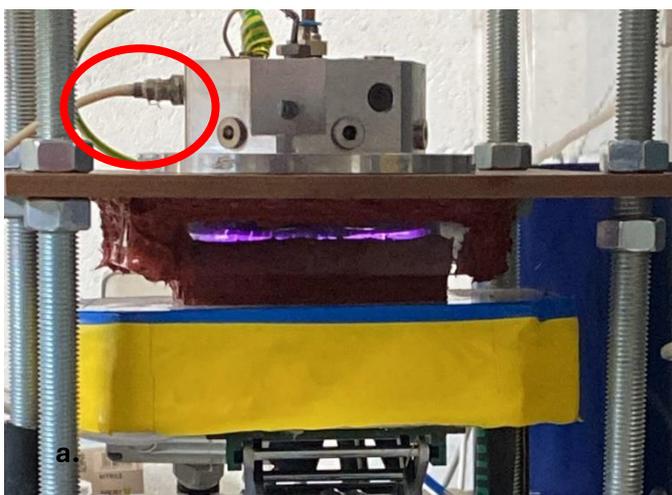


Figura 31 a. Reattore al plasma in configurazione DBD con ingresso laterale



Figura 31 b. Dettaglio della pompa peristaltica (A) Connessione della pompa peristaltica alla camera di reazione (B).

Per superare le limitazioni appena descritte è stata modificata la configurazione della camera di reazione con l'obiettivo di favorire l'afflusso di chitosano in fase vapore e garantire una distribuzione uniforme del rivestimento. Il nuovo setup prevede il posizionamento del tubo di imbocco della soluzione liquida e del gas in alto, sulla faccia superiore, integrando un ingresso superiore unico all'interno dello stesso blocco, con l'ausilio di una biforcazione [Fig.32]. Questa configurazione consente di evitare il gocciolamento laterale, migliorando la distribuzione del liquido sulla base di allumina. Inoltre, permette di ridurre le modifiche strutturali, mantenendo un design efficiente e funzionale, e di ottimizzare il processo di vaporizzazione, incrementando il tempo di permanenza del polimero all'interno della camera al fine di garantire una miscelazione più efficace tra gas e liquido. Infine, sono state rimosse le griglie trattate con colla d'argento poiché la fase di miscelazione descritta pocanzi ne ha reso superfluo l'utilizzo.

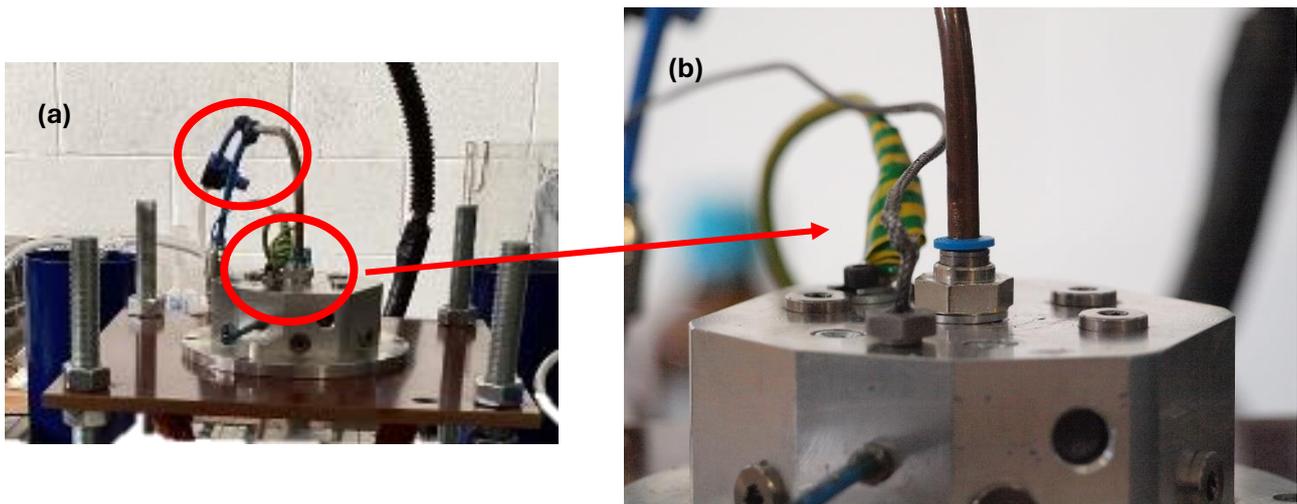


Figura 32. (a) Configurazione modificata della camera di reazione con dettaglio sulla biforcazione. (b) Dettaglio del tubo posizionato sulla faccia superiore della camera di reazione.

Nonostante l'ottimizzazione della configurazione, l'analisi sperimentale ha evidenziato due criticità principali: l'accumulo indesiderato di liquido all'interno della camera e la difficoltà di vaporizzazione dovuta all'elevata temperatura di ebollizione del chitosano. Queste osservazioni suggeriscono la necessità di ulteriori miglioramenti nel controllo termico e nella gestione della fase liquida da depositare.

Torcia al plasma

Al fine di garantire una maggiore efficienza nella deposizione del polimero, è stato valutato l'utilizzo di una torcia al plasma [Fig.32]. Questa tecnologia consente una regolazione più accurata della distribuzione del materiale, ottimizzando la dissipazione termica del sistema e migliorando la riproducibilità del processo, sebbene comporti tempi di realizzazione leggermente più estesi. In questo caso, sono stati utilizzati due approcci: immettere il chitosano nella torcia tramite la pompa peristaltica oppure utilizzare il *bubbler*, settando accuratamente i parametri, come illustrato nella seguente tabella [Tab. 13].

	Flusso soluzione chitosano (L/min)	Flusso di gas (l/min)			Condizioni plasma			
		He	Ar	O ₂	Tensione (kV)	Frequenza (kHz)	Tempo (s)	Temperatura (°C)
<i>Peristaltica</i>	0,4/0,8	/	7	/	12	12	60/120	130
<i>Bubbler</i>	0,4/0,8	/	7	/	12	12	250	130

Tabella 13. Parametri della torcia al plasma.

In un primo momento, è stato utilizzato un software (*MasterCam*®) che ha permesso di tracciare il percorso della torcia e, in seguito, è stato impostato il numero di tracciati totali da percorrere. Per movimentare il dispositivo, è stato invece utilizzato un ulteriore programma (*Repetier-Host*®), su cui è stato preventivamente importato un opportuno codice di programmazione (*G-code*). Il *G-Code* permette di impostare determinati parametri, quali i valori degli assi che la torcia deve raggiungere, il sistema di riferimento assoluto, il movimento in fase di deposizione, la velocità e l'accelerazione del movimento in fase di deposizione. Inizialmente, è stato impostato un tempo di deposizione pari a circa un minuto e corrispondente ad una sola passata di coating. In seguito, si è deciso di prolungare il tempo di deposizione a circa due minuti e mezzo, in modo tale da favorire la deposizione del coating. Il principale vantaggio dell'utilizzo della torcia al plasma risiede nella possibilità di seguire un tracciato definito con elevata precisione, garantendo così maggiore controllo sul processo ed evitando un aumento globale della temperatura.

In un primo momento, si è scelto di utilizzare la pompa peristaltica come mezzo per far fluire il chitosano all'interno della torcia. Tuttavia, in questo modo non era possibile vaporizzare il polimero a causa del suo elevato peso molecolare, motivo per cui si osservava un gocciolamento del materiale e l'effettivo trattamento al plasma avveniva in seguito [Fig.33 b]. Per superare tale limitazione, è stato implementato un sistema di erogazione del chitosano basato sull'utilizzo di un *bubbler* da collegare alla torcia, consentendo un'erogazione più stabile, evitando accumuli di liquido indesiderati nel sistema, ottimizzando in questo modo sia il processo di vaporizzazione del polimero che quello di deposizione.

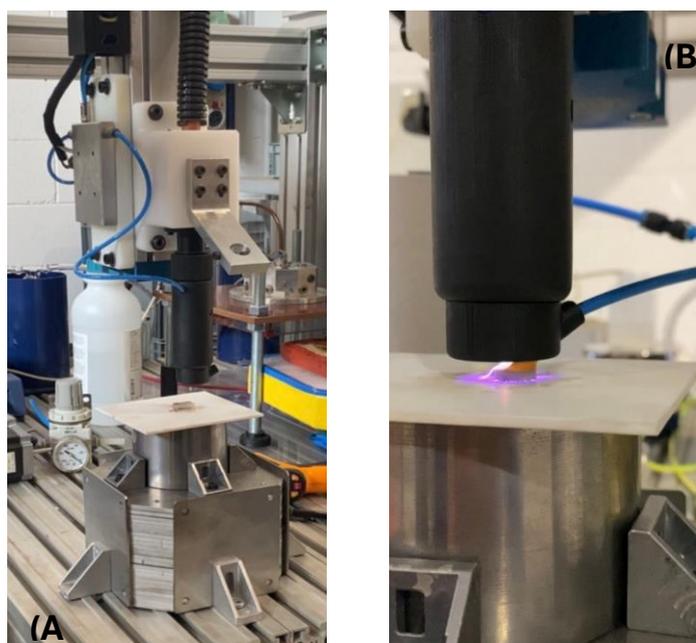


Figura 33. (A) Set-up della torcia al plasma, (B) Dettaglio della deposizione di chitosano con la torcia al plasma.

Caratterizzazioni

In seguito ai processi di funzionalizzazione al plasma effettuati in IRIS S.r.l. si prosegue con la caratterizzazione dei campioni più significativi presso il Politecnico di Torino per individuare l'effettiva presenza del coating sui campioni. Sono state condotte delle prove sia sui campioni trattati che non trattati. Nel dettaglio, per investigare la chimica superficiale è stata effettuata un'analisi spettroscopica in trasformata di Fourier nell'infrarosso (FTIR), per investigare morfologia e composizione ci si è serviti di un'analisi al microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FE-SEM) munito di spettroscopia a dispersione di energia (EDS), mentre per la valutazione della topografia e l'analisi profilometrica, è stato utilizzato il microscopio confocale a laser ottico.

Chimica Superficiale: Spettroscopia FT-IR

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) è una tecnica analitica utilizzata per identificare e caratterizzare i composti chimici attraverso l'interazione della radiazione infrarossa con la materia. Tale tecnica sfrutta la capacità delle molecole di assorbire la radiazione infrarossa a specifiche lunghezze d'onda, provocando transizioni tra diversi stati vibrazionali dei legami chimici. L'energia assorbita è caratteristica di ciascun tipo di legame, consentendo l'acquisizione di uno spettro infrarosso che rappresenta la cosiddetta impronta digitale della sostanza analizzata. Il principio di funzionamento della FTIR si basa sull'uso di un interferometro Michelson che modula la radiazione infrarossa prima che questa interagisca con il campione. La radiazione assorbita dal materiale viene registrata sotto forma di interferogramma e successivamente convertita in uno spettro di assorbimento mediante l'utilizzo della trasformata di Fourier. Lo spettro risultante è costituito da bande di assorbimento corrispondenti alle vibrazioni molecolari dei gruppi funzionali presenti nel campione, consentendone così la caratterizzazione.

Un parametro fondamentale in spettroscopia infrarossa è l'assorbanza (A), definita dalla legge di Lambert-Beer:

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

Dove I_0 rappresenta l'intensità della radiazione incidente e I quella della radiazione trasmessa dal campione. L'assorbanza è direttamente correlata alla concentrazione del composto analizzato e alla sua capacità di assorbire la radiazione infrarossa a una determinata lunghezza d'onda.

In questo caso è stata utilizzata una versione semplificata della FTIR, ovvero la FTIR-ATR (*Fourier Transform Infrared – Attenuated Total Reflectance*), che consente l'analisi di campioni senza richiedere preparazioni complesse. Tale tecnica si basa sul fenomeno della riflettanza totale attenuata (ATR). Questa si verifica quando un fascio di radiazione infrarossa incide su un cristallo ad elevato indice di

rifrazione con un angolo superiore al valore dell'angolo critico. In tali condizioni, si genera un'onda evanescente che penetra il campione per pochi micrometri. Se il campione assorbe radiazione infrarossa a determinate lunghezze d'onda, l'intensità della radiazione riflessa subisce una diminuzione proporzionale, permettendo la registrazione di uno spettro in assorbanza.

Al fine di svolgere un'analisi qualitativa dei gruppi superficiali presenti sui campioni funzionalizzati con il chitosano, è stato eseguito un confronto tra lo spettro FT-IR del polimero stesso con i campioni trattati e non trattati. Nel dettaglio, per condurre questo tipo di caratterizzazione, è stato utilizzato lo spettrometro Thermo Scientific® Nicolet iS50 FT-IR in modalità ATR.

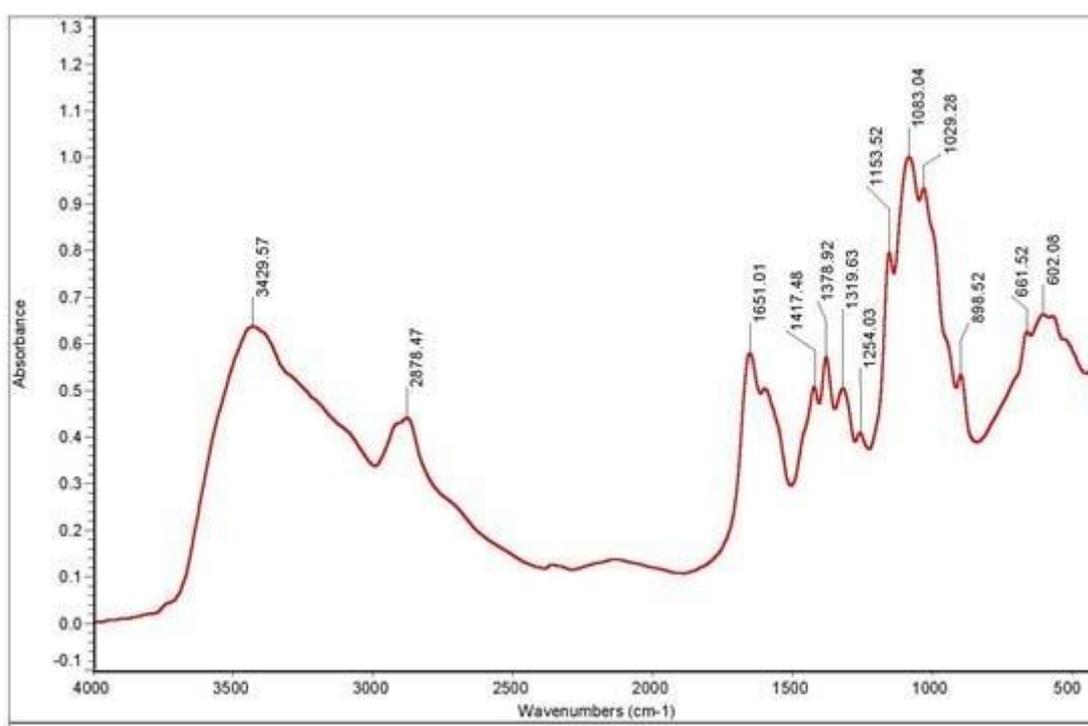


Figura 34. Spettro FTIR del chitosano commerciale.

Osservando lo spettro del chitosano commerciale [Fig. 34]⁸⁵, si osservano alcuni picchi di rilievo. Tra questi, emerge in primis il segnale a 3429 cm^{-1} , attribuibile allo stretching dei legami O-H e N-H. questa banda indica la presenza di gruppi ossidrilici e amminici, responsabili della capacità del chitosano di formare legami a idrogeno. Nel range ammidico dello spettro si individuano invece due bande fondamentali: la regione corrispondente allo stretching del legame C=O a 1651 cm^{-1} , tipico dei gruppi ammidici residui derivanti dalla parziale deacetilazione del chitosano, e la regione associata alle vibrazioni di deformazione dei legami N-H e allo stretching del legame C-N, fornendo indicazioni sul contenuto ammidico residuo e sul grado di deacetilazione (DD%) del polimero. Ulteriori Tratti caratteristici includono il picco a 1417 cm^{-1} , corrispondente allo stretching del legame C-H dei gruppi

metilici, e la banda tra 1378-1830 cm^{-1} , tipicamente attribuita allo stretching C-N combinato con la deformazione del legame N-H, nonché la banda tra 1080-1020 cm^{-1} , rappresentante lo stretching asimmetrico del gruppo C-O-C, caratteristico delle strutture glucosidiche del chitosano.

Topografia e rugosità: microscopia confocale a laser ottico

Il microscopio confocale a scansione laser è uno strumento basato su una tecnica avanzata di microscopia ottica che consente di ottenere immagini tridimensionali ad alta risoluzione di campioni biologici e materiali. Il suo principio di funzionamento si basa sull'uso di un sistema di illuminazione puntuale e selettivo che riduce la luce diffusa e il contrasto rispetto alla microscopia ottica convenzionale. Il principio di funzionamento di tale microscopio prevede l'utilizzo di un raggio laser focalizzato che scansiona il campione piano per piano, tramite un sistema di specchi oscillanti. La luce emessa o riflessa dal campione viene raccolta dall'obiettivo e convogliata verso un *pinhole*. Un diaframma circolare posizionato prima del rivelatore che consente il passaggio solo della luce proveniente dal piano focale (ovvero la zona perfettamente a fuoco, la luce proveniente dai piani fuori fuoco viene invece bloccata dal *pinhole*, riducendo la sfocatura e migliorando il contrasto dell'immagine. Poiché il microscopio illumina solo un piano alla volta, il sistema di scansione movimentata progressivamente il raggio laser scansionando l'intero campione. Questo avviene grazie a specchi oscillanti che deviano il raggio in modo controllato lungo le direzioni X e Y per generare una mappa bidimensionale del campione. Uno dei principali vantaggi dell'utilizzo di questa tecnica consiste nella possibilità di acquisire sezioni ottiche a diverse profondità, ottenendo in questo modo una serie di immagini bidimensionali lungo l'asse Z.

In questo studio, l'analisi è stata condotta con la lente 20x (+10x di ottico) del microscopio Zeiss® LSM 900, con un ingrandimento totale di 200x. L'apertura del *pinhole* viene mantenuta tra 29 e 460 μm , con un master gain tra 200 e 250 V e un numero di scansioni tra 80 e 100. Una volta ottenuta la ricostruzione dell'immagine, vengono applicati in successione due filtri, un passabasso a 8 μm per la *waviness* e un passa alto a 250 μm per la *roughness*, applicando delle *threshold* quando necessario. Sono stati in seguito estratti alcuni parametri di rugosità, tra cui l'altezza quadratica media (S_q), fondamentale per la comparazione degli spessori dei coating ottenuti con le diverse configurazioni.

Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS

La microscopia elettronica a scansione a emissione di campo (FESEM, Field Emission Scanning Electron microscopy) è una tecnica di imaging ad alta risoluzione che consente di ottenere immagini dettagliate della morfologia superficiale di un determinato campione. Il principio di funzionamento prevede l'utilizzo di un fascio di elettroni, generato da un cannone a emissione di campo. Gli elettroni vengono accelerati e focalizzati sul campione mediante un sistema di lenti elettromagnetiche. Quando

il fascio interagisce con la superficie del campione, vengono principalmente prodotte due tipologie di segnale: un primo tipo generato dall'urto elastico delle particelle, secondo cui l'elettrone viene riflesso con un angolo piccolo rispetto alla verticale alla superficie del campione (*backscattered electron*, BE), oppure un segnale generato in seguito ad urto anelastico con perdita di energia, provocando la diffusione di elettroni del materiale analizzato in direzione completamente diversa a quella di incidenza (*Secondary electron*, SE). I segnali emessi dal campione vengono poi raccolti da rilevatori distinti per i BE e per i SE, in quanto forniscono informazioni diverse.

Per investigare la composizione dei campioni analizzati è possibile, utilizzando il SEM da banco (JEOL® JCM6000Plus), effettuare un'analisi spettroscopica a dispersione di energia (*energy dispersive spectroscopy*, EDS). Il principio di funzionamento prevede l'emissione di raggi X generati in seguito all'interazione tra il fascio di elettroni e gli atomi del campione che vengono in seguito catturati da un particolare e analizzati per ottenere informazioni composizionali.

I campioni sono stati prima attaccati con colla d'argento su dei supporti circolari (stub) e in seguito sono stati sottoposti a metallizzazione tramite sputtering con cromo (utilizzando il Quorum® Q 150T S plus). Una volta rivestiti, i campioni sono stati posti all'interno della camera dello strumento, applicando il vuoto ad una pressione di $1,5 \cdot 10^{-5}$ Torr. Successivamente è stato applicato un voltaggio ad alta tensione di 5 kV, mantenendo una distanza compresa tra 4 e 6 mm tra la sonda e il campione. L'osservazione è stata condotta a diversi ingrandimenti utilizzando il sensore InLens rispettivamente a 500x, 1000x, 5000x, 10000x, 50000x, 100000x, 200000x.

Risultati

Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS

Le immagini ottenute in microscopia elettronica non sempre hanno rivelato la presenza di un coating uniforme e omogeneo sui campioni rivestiti con chitosano, prima con il plasma DBD e in seguito tramite la torcia. Nei campioni in cui il polimero è stato depositato utilizzando il DBD, è stato depositato, nella maggior parte dei casi, uno strato di coating troppo spesso per via del gocciolamento del polimero in forma liquida. Per quanto riguarda il trattamento mediante torcia, specialmente quando si è scelto di somministrare il chitosano mediante *bubbler*, già ad occhio nudo è stato evidenziato un alone iridescente su ciascun campione, anche se meno evidente sul pellet di HAp [Fig.35].

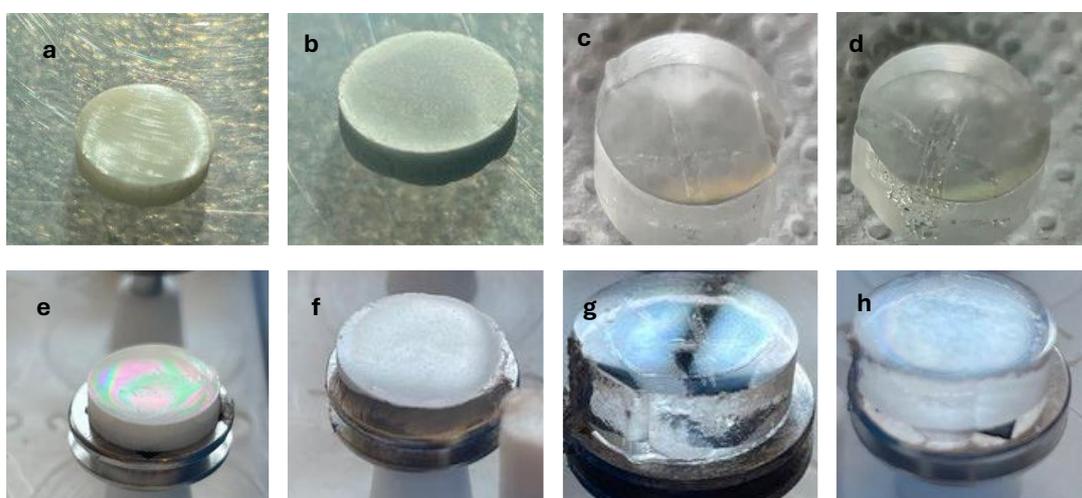


Figura 35. (a, e) campioni di controllo e trattato di YSZ, (b, f), campioni di controllo e trattato di HAp, (c, g) campione di controllo e trattato di SBA2, (d, h) campione di controllo e trattato di S53P4.

Si procede con l'analisi qualitativa dei campioni trattati nei seguenti casi:

- Trattamento con reattore al plasma in configurazione DBD e somministrazione del chitosano mediante pompa peristaltica;
- Trattamento mediante torcia al plasma e somministrazione del chitosano mediante pompa peristaltica;
- Trattamento mediante torcia al plasma e somministrazione del chitosano mediante *bubbler*.

Andando a visualizzare le immagini al FE-SEM relative all'idrossiapatite [Fig.36], si può affermare come nel primo caso si veda la struttura tipica del materiale in sé, nonché le righe lasciate dal processo di lucidatura. A ingrandimenti maggiori (200000x), tale struttura risulta ancora visibile, segno che la deposizione del coating non è andata a buon fine. Visualizzando le immagini relative al campione trattato con torcia, si evince come in questo caso vi sia un leggero miglioramento. Si riscontra infatti una sorta di rivestimento, accentuato dalla presenza di agglomerati globulari (immagine a 10000x), circondati da una "struttura a maglia". Probabilmente, questo effetto dipende dal fatto che il chitosano

possa essere gocciolato sul campione in fase di deposizione e in seguito abbia aderito a questo grazie all'utilizzo della torcia. Tuttavia, si tratta comunque di un coating poco omogeneo e disuniforme. Nell'ultimo caso, avendo adoperato il *bubbler* e avendo quindi somministrato il polimero già in fase vapore, si riscontra un alone omogeneo sul campione in quanto scompaiono le righe tipiche della lucidatura, oltre alla presenza di cristalli sparsi.

Per quanto riguarda la zirconia [Fig.37], nel caso iniziale, con l'utilizzo del reattore in configurazione DBD e somministrazione di chitosano mediante peristaltica, anche a ingrandimenti maggiori, non si riesce a individuare alcun tipo di coating o particella adesa alla superficie del campione. La situazione sembra migliorare leggermente con l'utilizzo del trattamento mediante torcia al plasma. Nel secondo caso, infatti, si evidenzia sul campione una zona caratterizzata da una "struttura grinzosa" non uniforme, alternata alla presenza di agglomerati di cristalli dovuta ad un probabile gocciolamento del polimero. Nell'ultimo caso, analizzando il campione di zirconia sottoposto al Pretrattamento 4, si denota una maggiore uniformità del coating, caratterizzato sempre dallo stesso tipo di struttura, molto visibile a ingrandimenti minori (1000x). A ingrandimenti maggiori (da 10000x), si evidenziano invece delle forme globulari probabilmente imputabili ad un eventuale eccesso di coating in fase di cristallizzazione.

Nei vetri bioattivi, in particolare per l'S53P4 [Fig.38], si evidenzia nella colonna relativa al trattamento mediante DBD, la presenza di uno strato di coating piuttosto spesso con cristalli di chitosano sparsi e incastonati all'interno di questo (immagine a 10000x). Nei trattamenti successivi effettuati con la torcia, si raggiunge invece una situazione leggermente più stabile: nel caso in cui la somministrazione del polimero sia avvenuta tramite pompa peristaltica, si ha anche in questo caso una situazione non molto omogenea, in cui risaltano zone che presentano la struttura intrecciata vista anche nei ceramici, alternate a zone in cui sono presenti agglomerati di polimero cristallizzato. Solo nell'ultimo caso, quando il chitosano viene immesso mediante *bubbler*, sembra essere presente un coating uniforme e sottile su tutta la superficie del campione, caratterizzato dalla formazione di cristalli sparsi che potrebbero essere identificati come i precursori della struttura a maglia vista precedentemente.

Caso analogo è quello dello SBA2 [Fig.39] dove, tra tutti i campioni analizzati, sembra aver dato un migliore risultato nell'applicazione del plasma con DBD, in quanto nelle immagini al FESEM risalta la formazione di cristalli simil cubici sulla superficie del vetro. L'utilizzo della torcia e della pompa peristaltica ha portato alla formazione di uno spesso strato di coating caratterizzato dalla presenza di agglomerati di polimeri in fase solida, probabilmente dovuto al gocciolamento del chitosano. Nel caso di utilizzo del *bubbler*, sembra invece che sia stato depositato un rivestimento omogeneo più sottile con la formazione di elementi cristallini sparsi su tutta la superficie del campione.

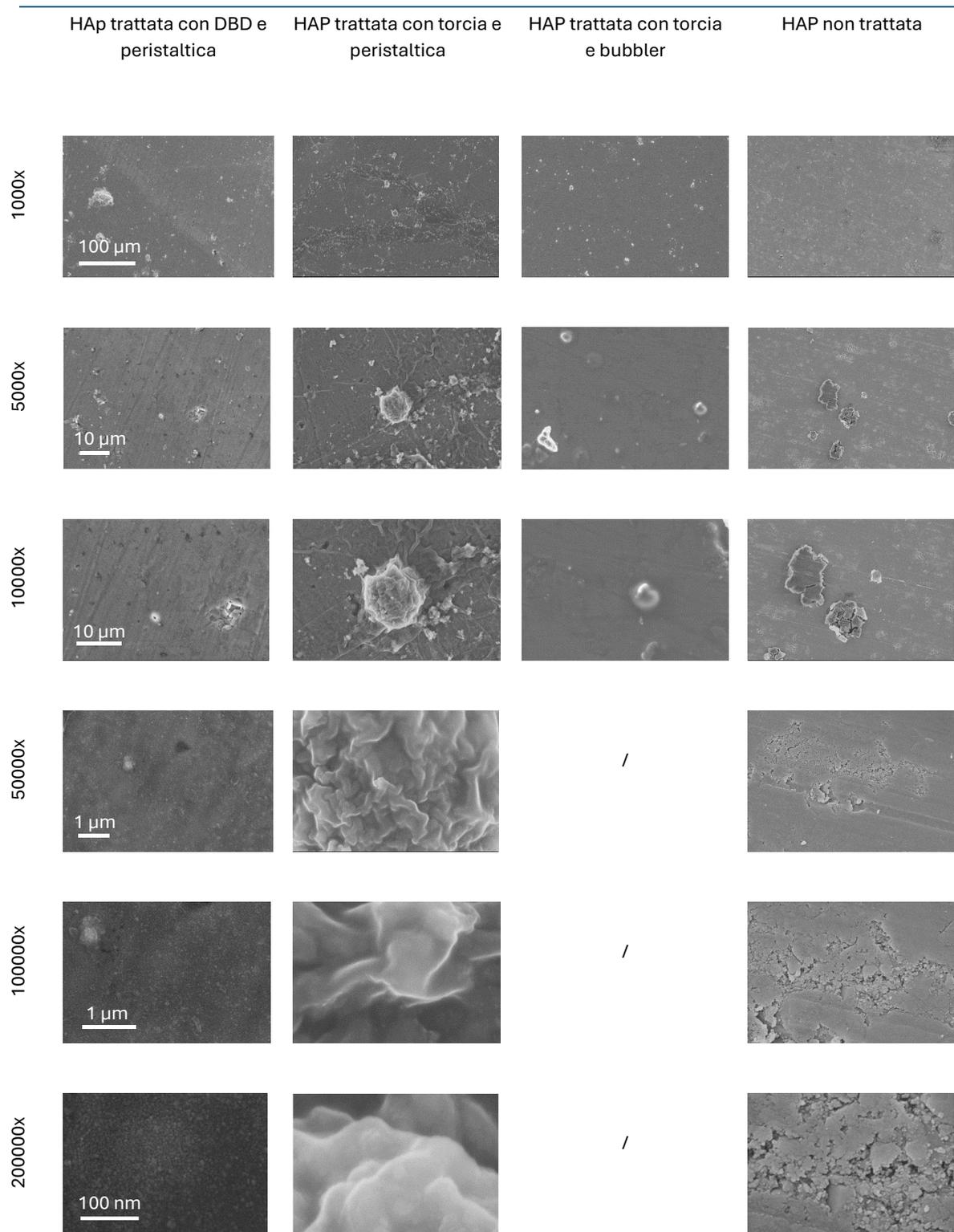


Figura 36. Immagini a ingrandimenti crescenti (1000x, 5000x, 10000x, 50000x, 100000x, 200000x) ottenute al microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FE-SEM) per i campioni di HAp trattati con plasma in configurazione DBD e torcia al plasma.

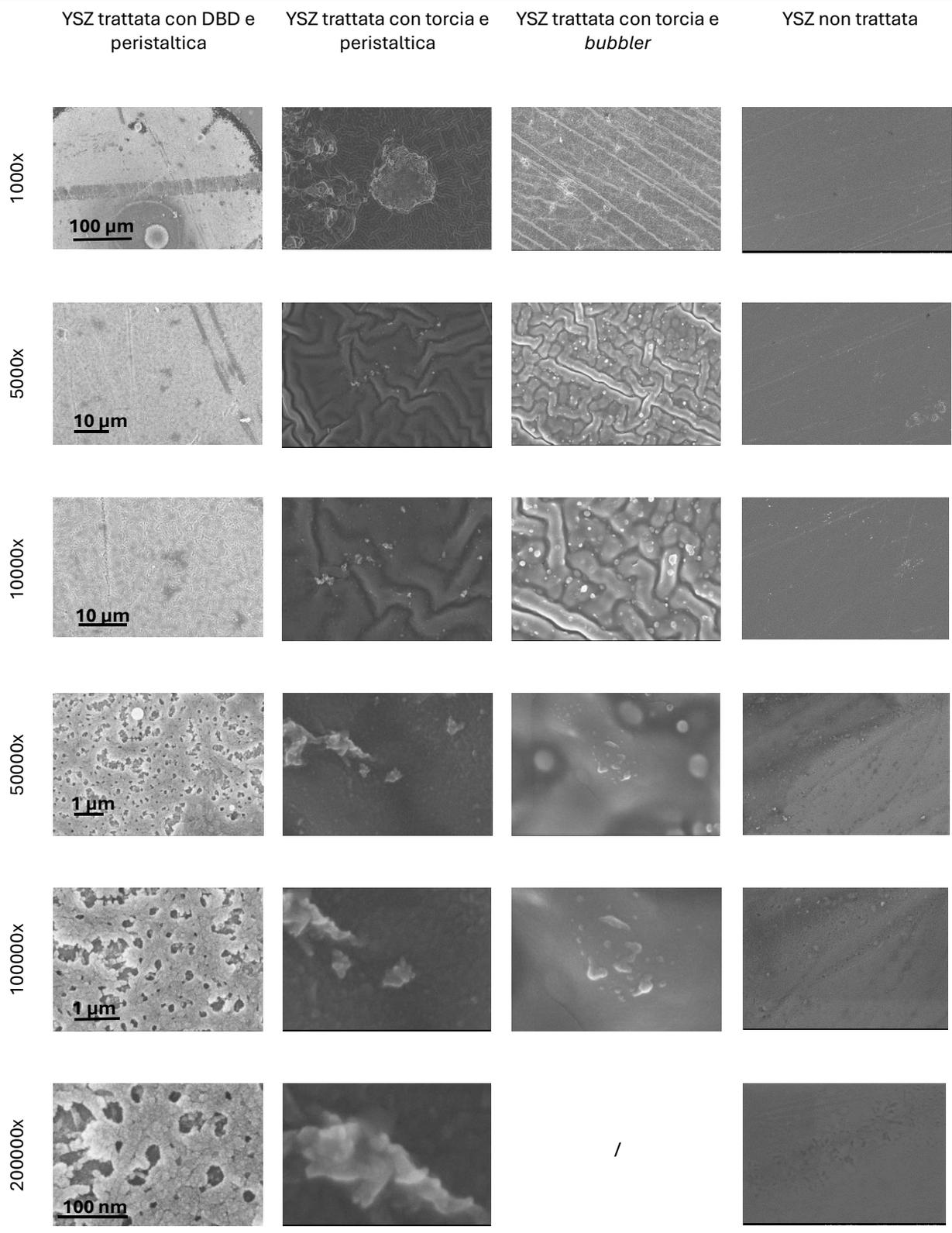


Figura 37. Immagini a ingrandimenti crescenti (1000x, 5000x, 10000x, 50000x, 100000x, 200000x) ottenute al microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FE-SEM) per i campioni di YSZ trattati con plasma in configurazione DBD e torcia al plasma.

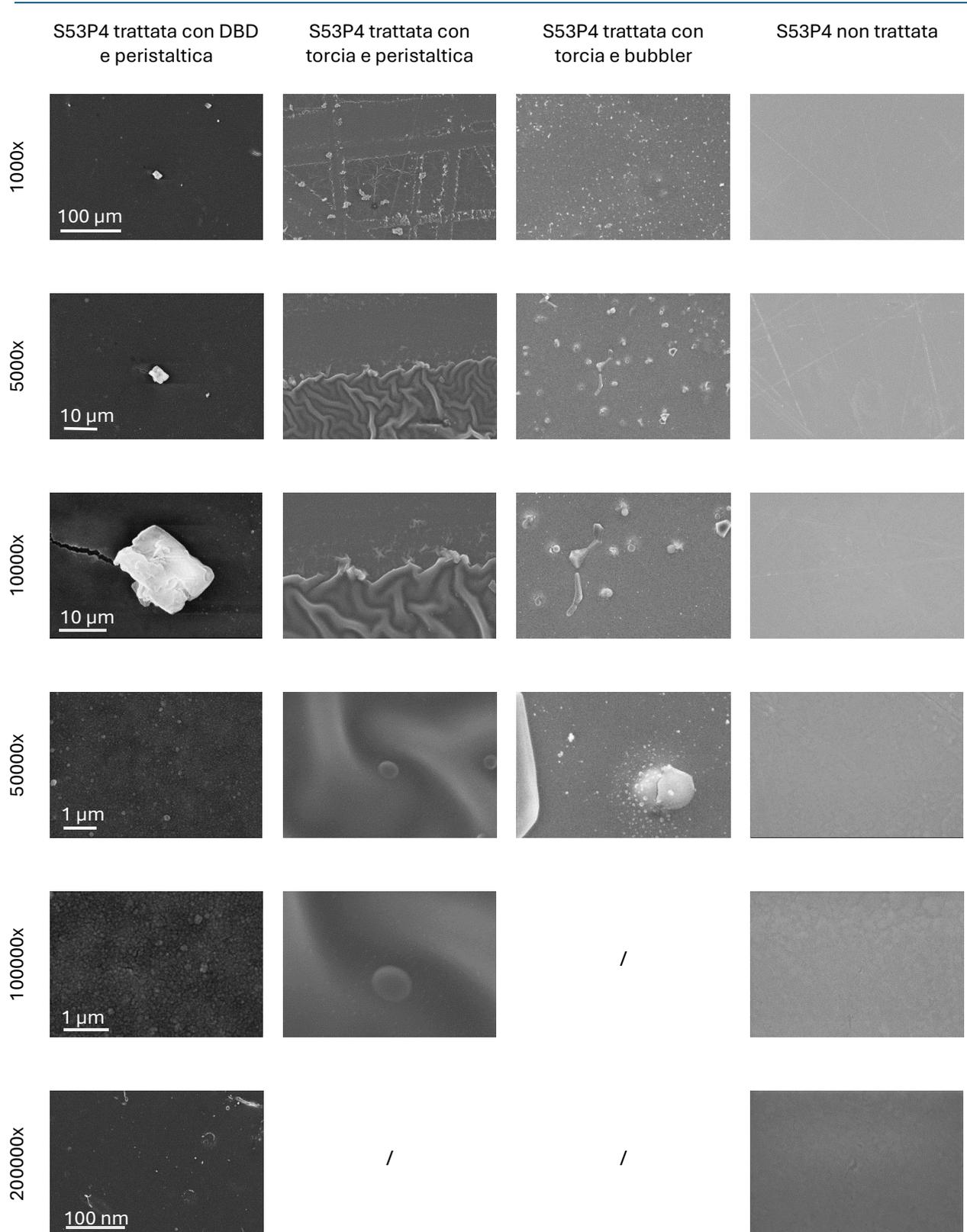


Figura 38. Immagini a ingrandimenti crescenti (1000x, 5000x, 10000x, 50000x, 100000x, 200000x) ottenute al microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FE-SEM) per i campioni di S53P4 trattati con plasma in configurazione DBD e torcia al plasma.

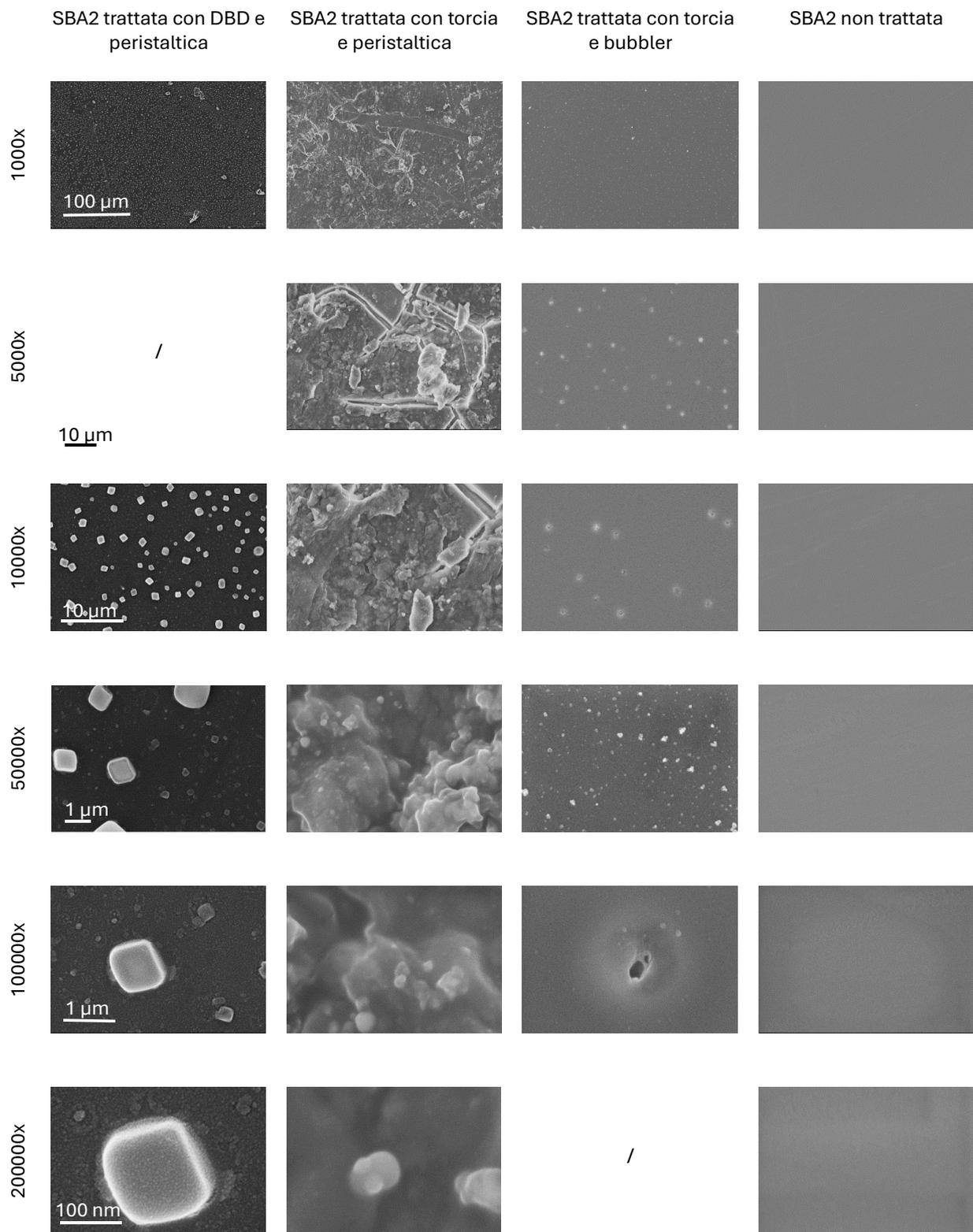


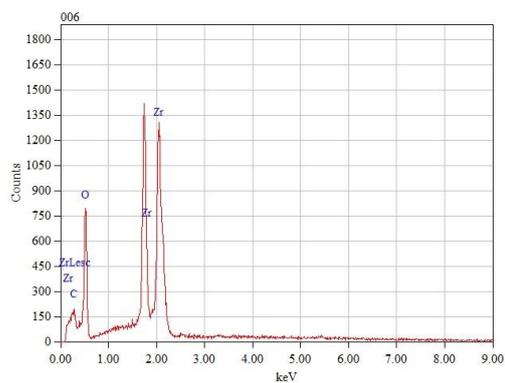
Figura 39. Immagini a ingrandimenti crescenti (1000x, 5000x, 10000x, 50000x, 100000x, 200000x) ottenute al microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FE-SEM) per i campioni di SBA2 trattati con plasma in configurazione DBD e torcia al plasma.

Si procederà adesso con il commento dei risultati relativi all'utilizzo della torcia al plasma in combinazione con la somministrazione del chitosano mediante *bubbler*, in quanto tale configurazione ha fornito risultati migliori per omogeneità e spessore del coating.

Per quanto riguarda le percentuali in peso (%wt) e atomiche (%at) analizzate all'EDS, si riscontra in quasi tutte le tipologie di materiali sottoposti all'ultimo trattamento tramite torcia in combinazione con l'uso del *bubbler*, un aumento nella frazione di carbonio relativo alla composizione del chitosano adesivo alla superficie del campione. Tale fenomeno si osserva principalmente nella YSZ [Fig.40] sottoposta al Pretrattamento 4, in cui sono stati amplificati i parametri di processo (tensione e voltaggio).

(a)

YSZ CH	% wt	% at
C	8,31	16,69
O	47,50	71,62
Zr	44,19	11,69



(b)

YSZ NT	% wt	% at
C	ND	ND
O	26,56	67,34
Zr	73,44	32,66

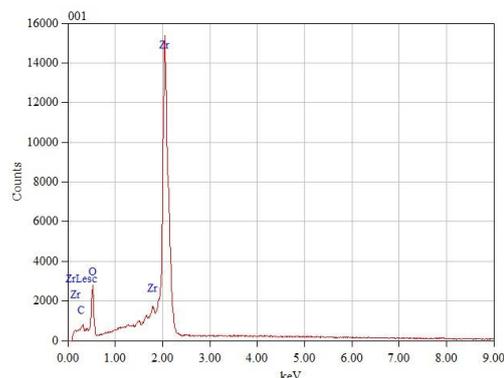
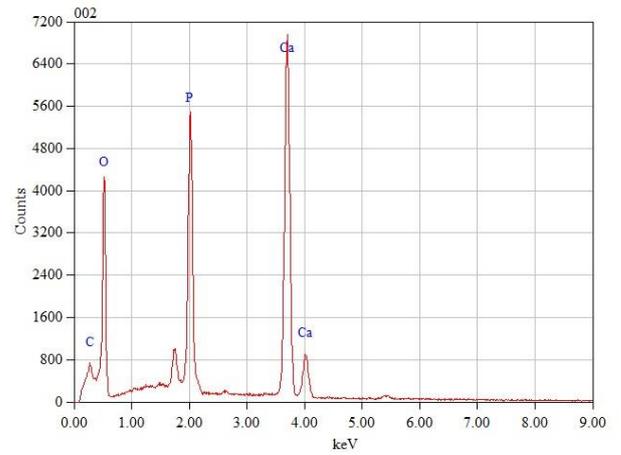


Figura 40. Composizioni in peso (%wt) e atomiche (%at) e spettri EDS della YSZ (a) trattata con chitosano mediante torcia al plasma e non trattata (b).

Anche nei vetri bioattivi [Fig. 42-43] si riscontra un aumento delle percentuali di carbonio, seppur in modo meno marcato. Nella HAp [Fig.41], tuttavia, questo fenomeno non si verifica. Si può in ogni caso affermare che, dopo il trattamento, si denota per tutti i materiali una diminuzione della percentuale degli elementi principali della composizione, oltre ad un marcato aumento dell'ossigeno, indicatori dell'avvenuta deposizione del coating.

(a)

<i>HAp CH</i>	% wt	% at
C	2,84	5,10
O	49,62	66,98
P	14,50	10,11
Ca	33,04	17,81



(b)

<i>HAp NT</i>	% wt	% at
C	2,76	5,32
O	40,80	59,12
P	17,07	12,78
Ca	39,37	22,78

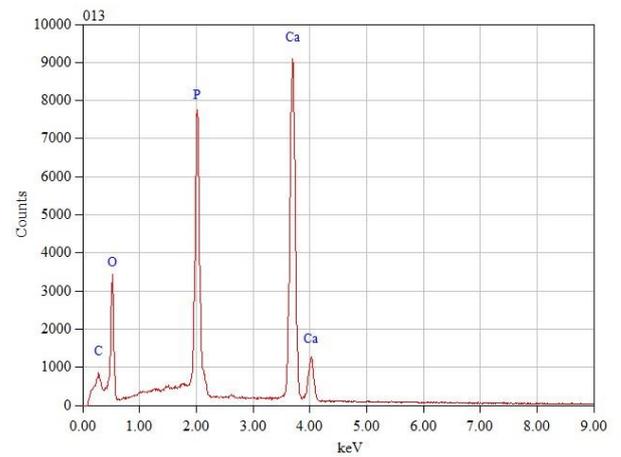
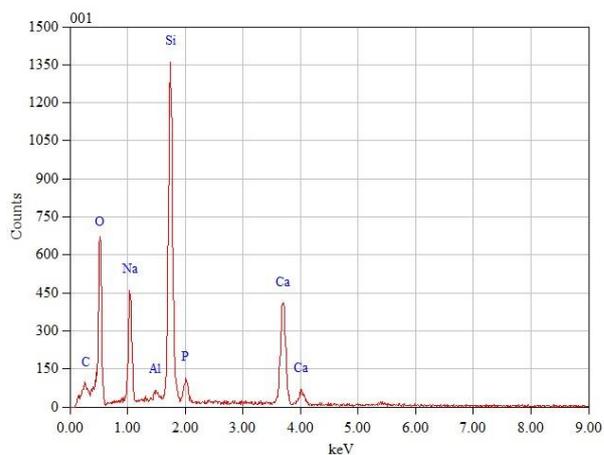


Figura 41. Composizioni in peso (%wt) e atomiche (%at) e spettri EDS della HAp (a) trattata con chitosano mediante torcia al plasma e non trattata (b).

(a)

SBA2 CH	% wt	% at
C	4,15	7,18
O	42,91	55,68
Na	10,66	9,63
Al	0,63	0,49
Si	23,04	17,03
P	2,35	1,57
Ca	16,25	8,42



(b)

SBA2 NT	% wt	% at
C	0,74	1,36
O	39,55	54,32
Na	13,15	12,57
Al	0,70	0,57
Si	23,53	18,41
P	3,24	2,30
Ca	19,09	10,47

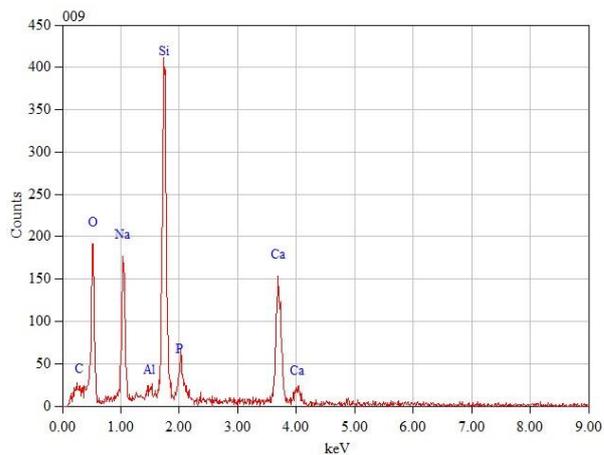
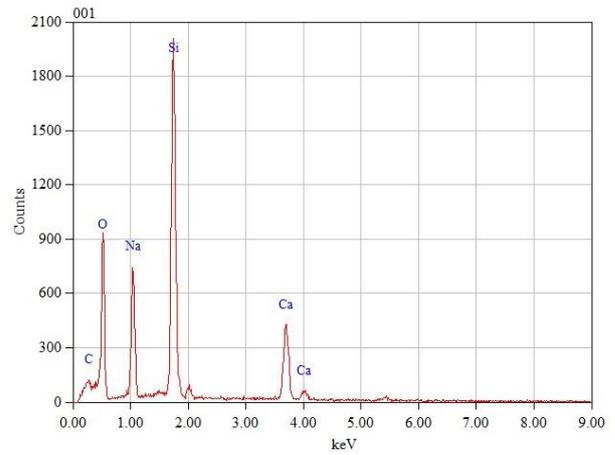


Figura 42. Composizioni in peso (wt) e atomiche (%at) e spettri EDS del vetro bioattivo SBA2 (a) trattato con chitosano mediante torcia al plasma e non trattato (b).

(a)

S53P4 CH	% wt	% at
C	5,03	8,54
O	42,15	53,74
Na	12,71	11,28
Si	27,74	20,15
Ca	12,37	8,42



(b)

S53P4 NT	% wt	% at
C	6,15	10,53
O	38,36	49,34
Na	16,15	14,46
Si	23,54	17,25
P	2,07	1,38
Ca	16,25	8,42

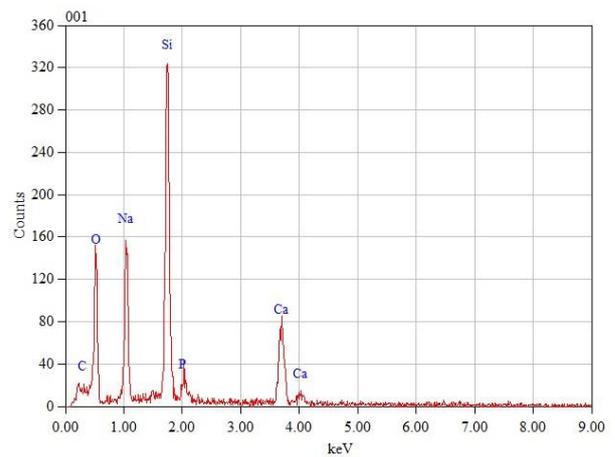


Figura 43. Composizioni in peso (%wt) e atomiche (%at) e spettri EDS del vetro bioattivo S53P4 (a) trattato con chitosano mediante torcia al plasma e non trattato (b).

Topografia e rugosità: microscopia confocale a laser ottico

Si propongono di seguito alcune catture eseguite sui campioni sia non trattati che sottoposti al trattamento al plasma mediante torcia con il microscopio confocale in modalità ottica ad ingrandimenti progressivi (5x, 10x, 20x, 50x) in modo da confrontare la morfologia superficiale prima e dopo la fase di deposizione del polimero.

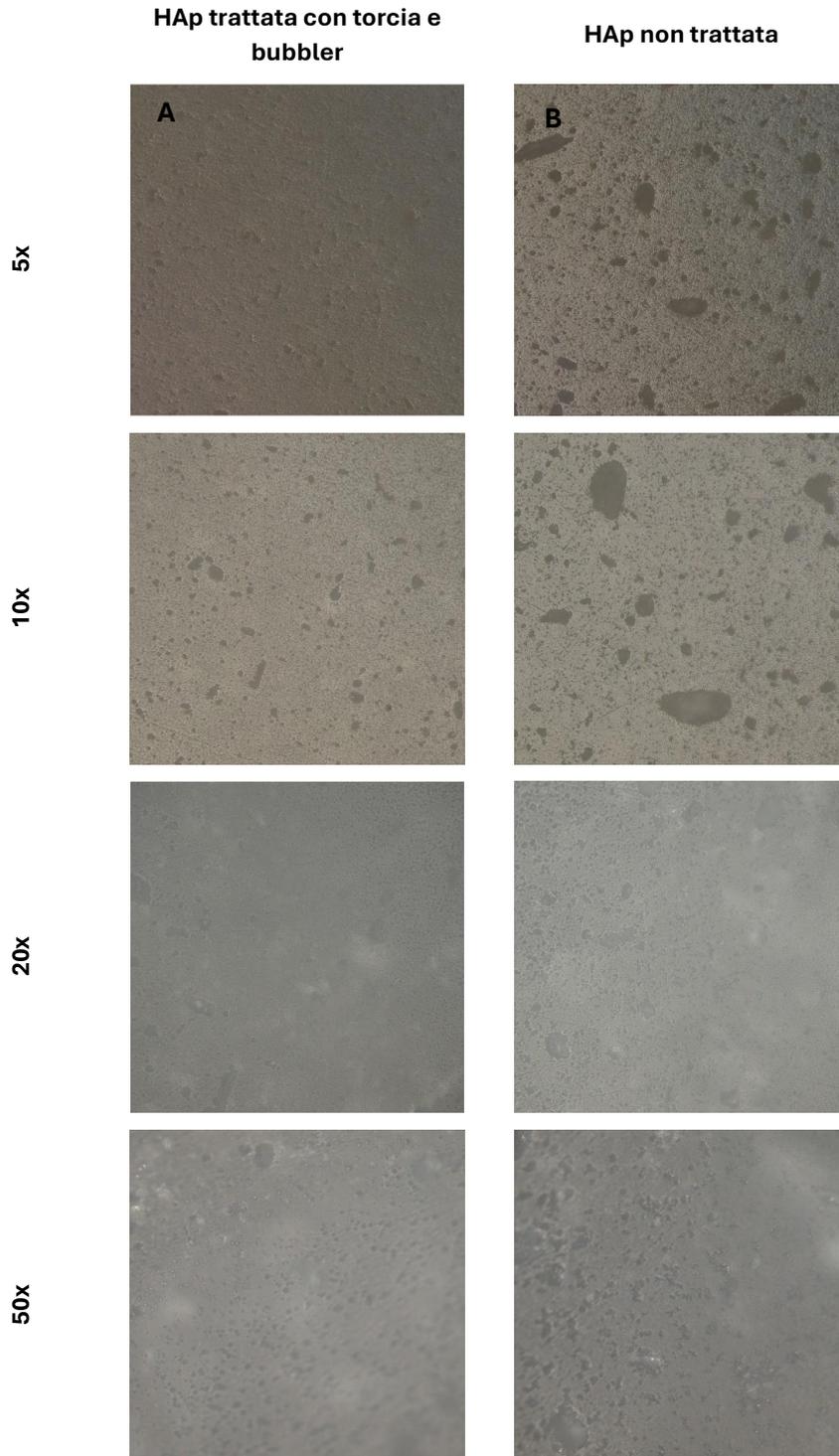


Figura 44. Immagini ad ingrandimenti progressivi ottenute in microscopia ottica dei campioni di HAp trattati con chitosano (colonna A) e non trattati (colonna B).

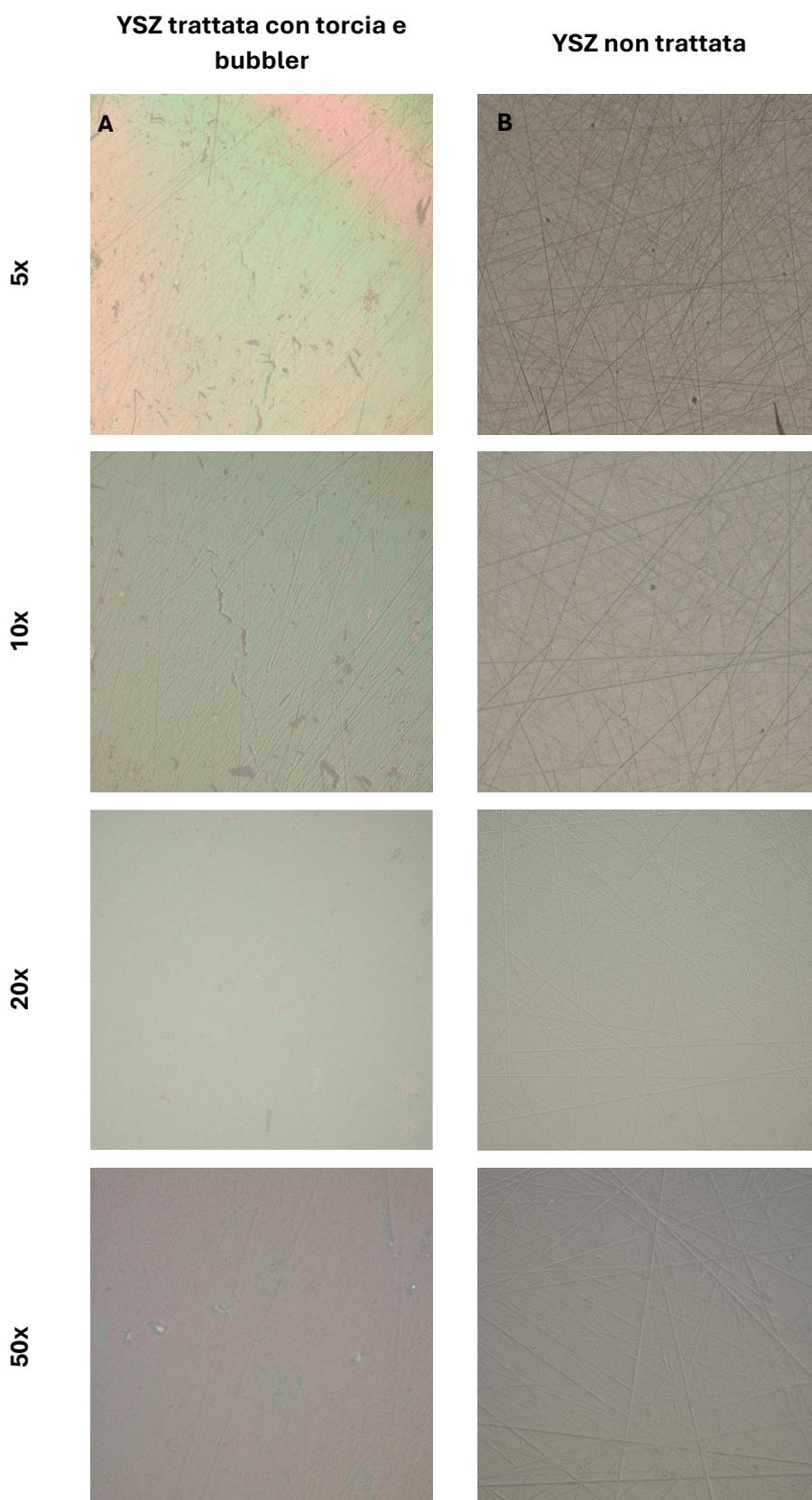


Figura 45. Immagini ad ingrandimenti progressivi ottenute in microscopia ottica dei campioni di YSZ trattati con chitosano (colonna A) e non trattati (colonna B).

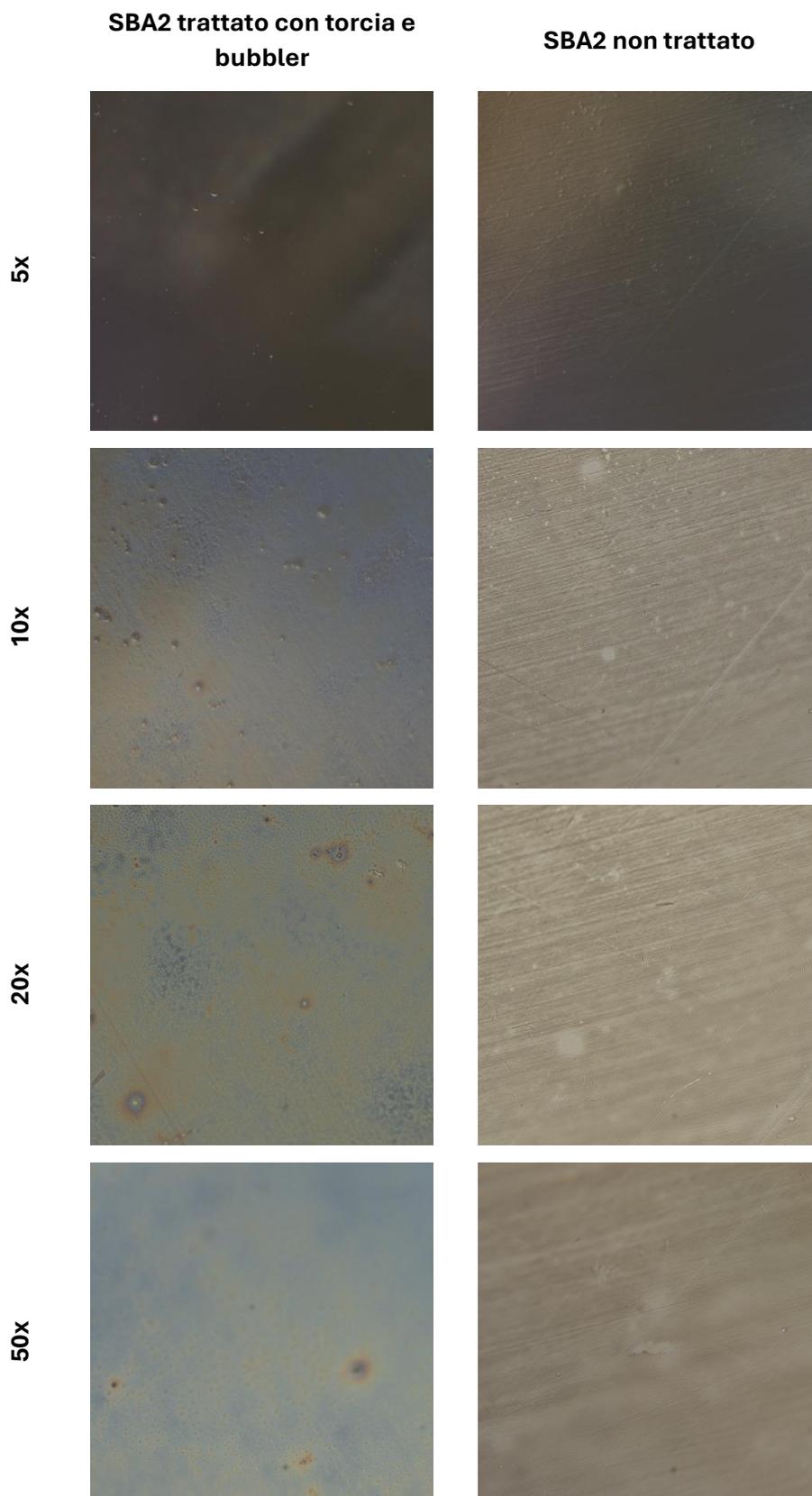


Figura 46. Immagini ad ingrandimenti progressivi ottenute in microscopia ottica dei campioni di SBA2 trattati con chitosano (colonna A) e non trattati (colonna B).

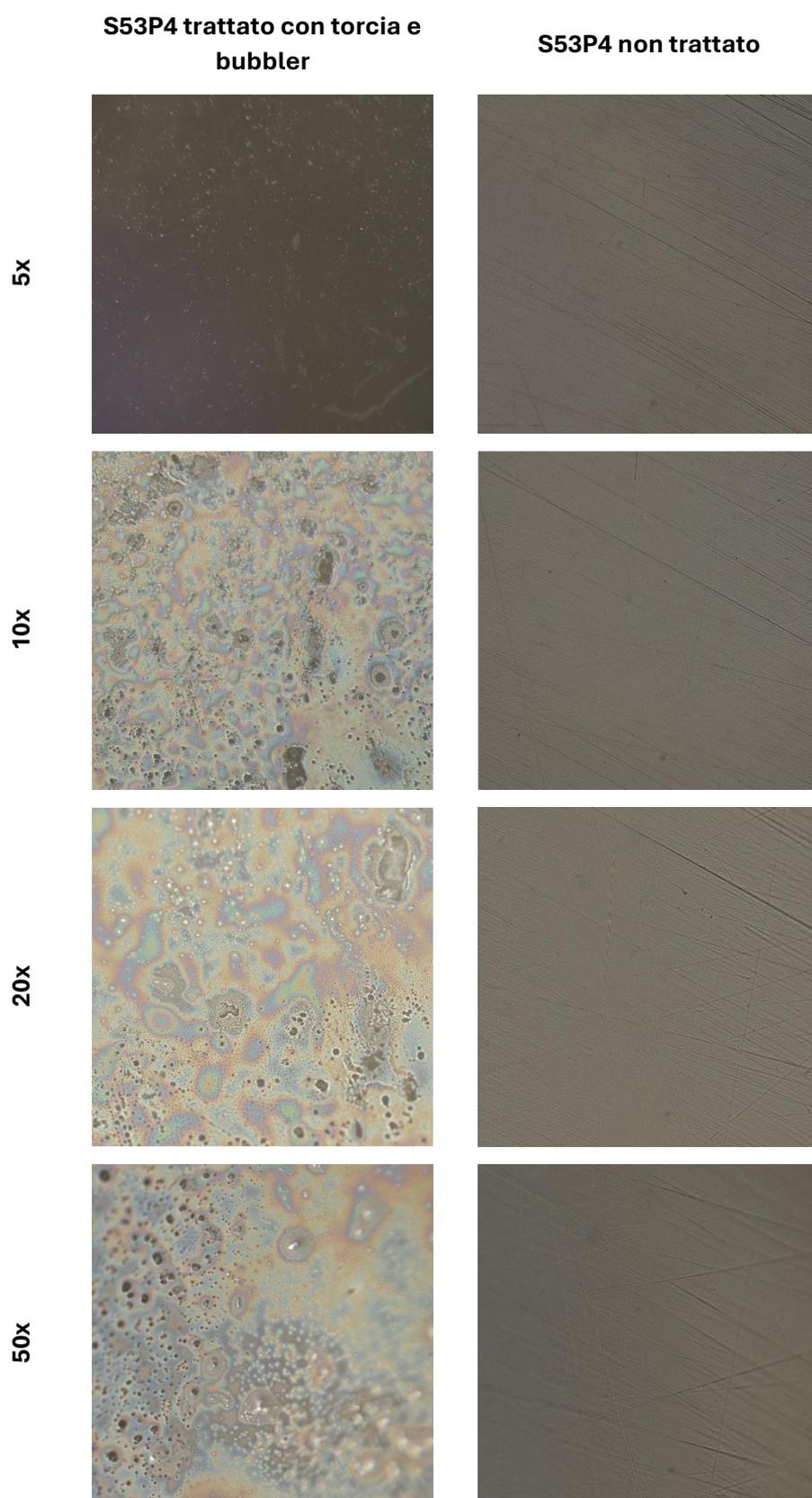


Figura 47. Immagini ad ingrandimenti progressivi ottenute in microscopia ottica dei campioni di S53P4 trattati con chitosano (colonna A) e non trattati (colonna B).

Le immagini relative all'HAp [Fig.44] non mostrano differenze significative tra il campione trattato mediante torcia e quello non trattato, in quanto la morfologia superficiale sembra rimanere invariata, confermando quanto rilevato per mezzo dell'EDS. I campioni successivi sono invece più significativi, in quanto già a bassi ingrandimenti, si evince la presenza di un rivestimento dalla colorazione iridescente e la scomparsa dei solchi causati dalla lucidatura. Questo aspetto risulta più evidente nel caso della YSZ [Fig.45] e del vetro bioattivo S53P4 [Fig.47], leggermente meno intuitiva nel vetro bioattivo SBA2 [Fig.46].

Tali risultati vengono confermati anche dalle misure effettuate al microscopio confocale, andando a confrontare i parametri di rugosità ottenuti sia nei campioni trattati con torcia che in quelli non trattati. Nel dettaglio, per HAp [Fig. 48] e YSZ [Fig.49] si riscontra una diminuzione della rugosità dopo il trattamento, fattore probabilmente imputabile al riempimento dei solchi della lucidatura con il materiale polimerico. Nel caso dei vetri bioattivi SBA2 [Fig.50] e S53P4 [Fig.51], si evidenzia invece un aumento della rugosità, specialmente nell'ultimo caso dove la superficie del coating appare ricoperta da uno strato uniforme di rivestimento. Questo risultato potrebbe prescindere dal fatto che si parte da una superficie lucidata, quindi a effetto specchio, che tende a diventare rugosa nel momento in cui vi si deposita sopra uno strato di coating, al contrario dei materiali ceramici che, durante la fase di lucidatura, vengono principalmente rigati, aumentando la presenza di solchi superficiali nella fase iniziale del processo.

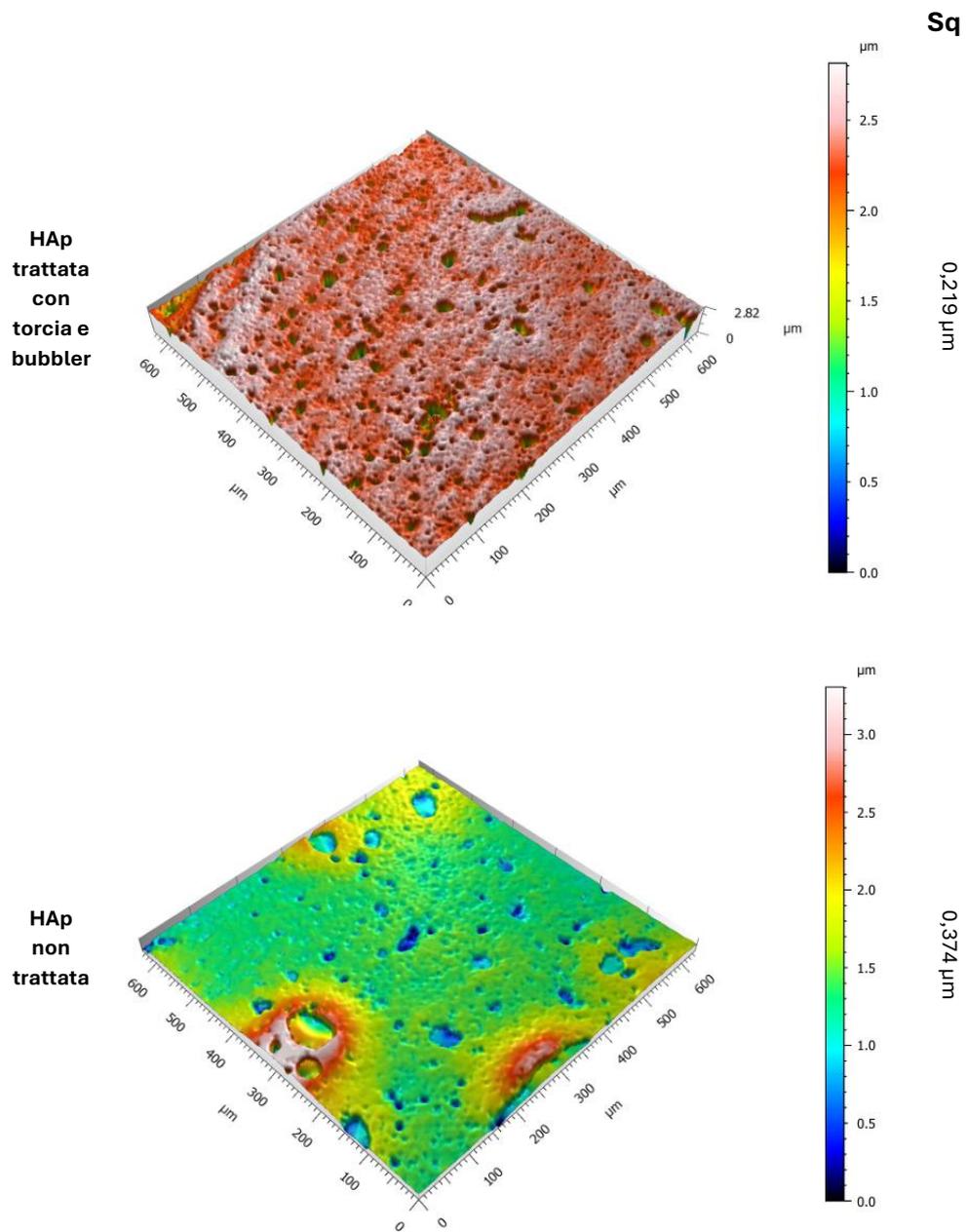


Figura 48. Confronto al microscopio ottico confocale tra HAp trattata con chitosano e HAp non trattata, con valore di rugosità (Sq) riportato a lato.

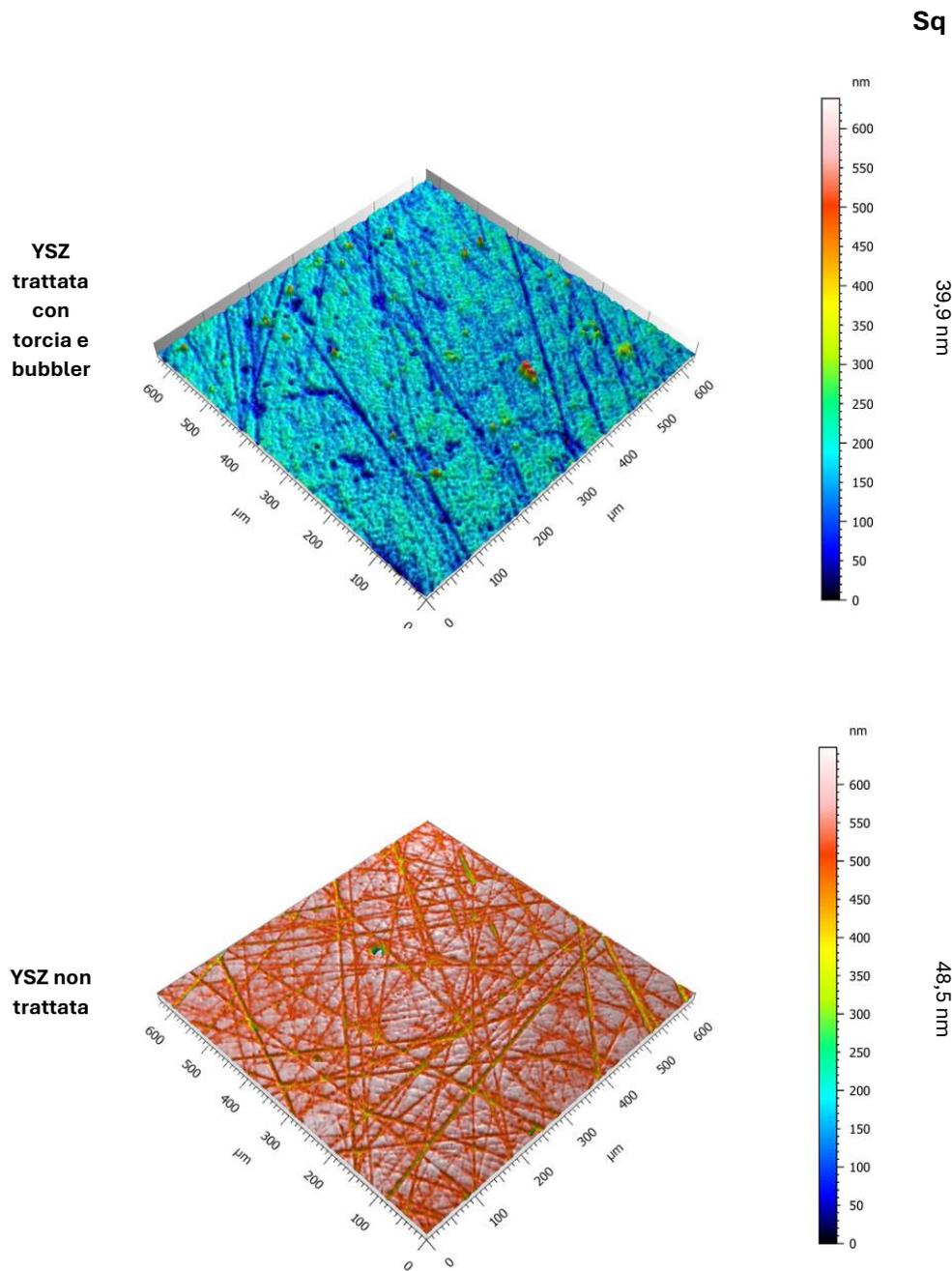


Figura 49. Confronto al microscopio ottico confocale tra YSZ trattata con chitosano e YSZ non trattata, con valore di rugosità (Sq) riportato a lato.

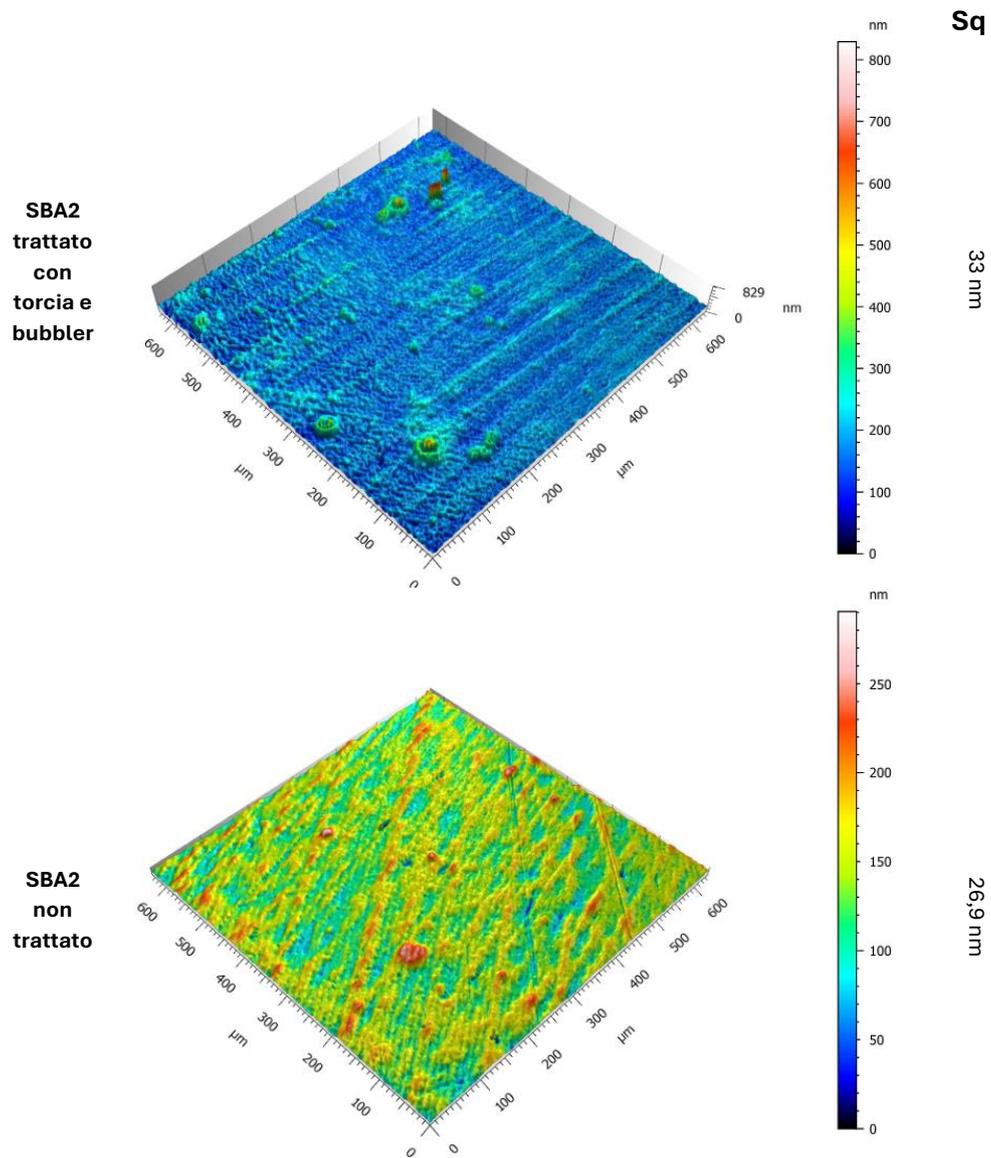


Figura 50. Confronto al microscopio ottico confocale tra SBA2 trattato con chitosano e SBA2 non trattato, con valore di rugosità (S_q) riportato a lato.

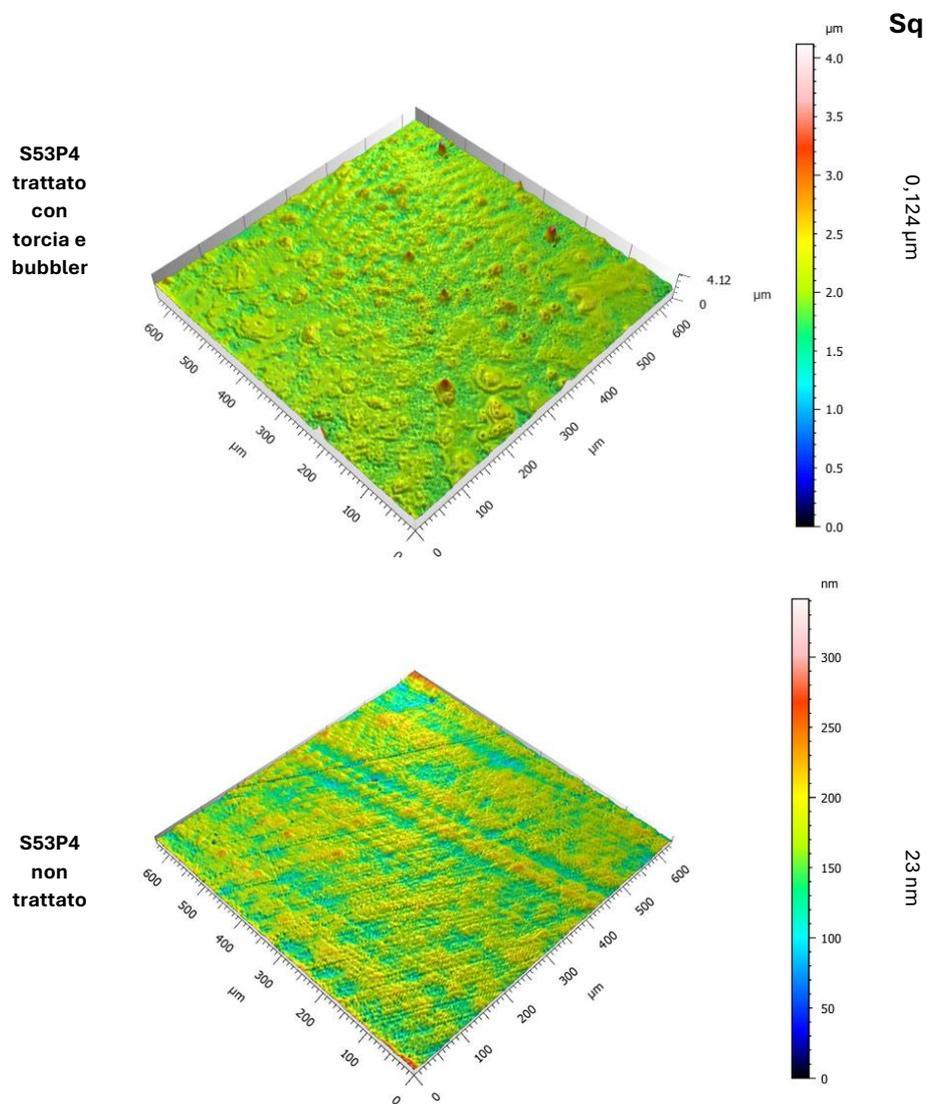


Figura 51. Confronto al microscopio ottico confocale tra S53P4 trattato con chitosano e S53P4 non trattato, con valore di rugosità (S_q) riportato a lato.

Chimica superficiale: spettroscopia FTIR

Sono stati ricavati gli spettri FTIR sia dei campioni sottoposti a trattamento che di quelli non trattati. Tuttavia, il chitosano non risulta sufficientemente visibile con l'utilizzo di questa tecnica, probabilmente a causa dello spessore estremamente sottile del coating nei campioni trattati con torcia, per cui non è in grado di assorbire in modo significativo la radiazione IR.

Per quanto riguarda l'HAp, si confrontano gli spettri del materiale sia trattato che non trattato con il chitosano puro [Fig.52], facendo riferimento per ognuna alle bande significative del polimero descritte nel Paragrafo "Chimica Superficiale: Spettroscopia FT-IR". Le bande significative del polimero sono tuttavia sovrapposte a quelle del materiale ceramico, motivo per cui Risulta difficile avere una conferma della presenza effettiva del coating. Altra condizione comune agli spettri di tutti i materiali trattati, è la scomparsa della banda relativa al legame O-H, imputabile alla formazione del legame tra superficie del materiale e polimero. Si evidenzia tuttavia, una modifica morfologica dei picchi dei campioni soggetti a trattamento nel range 1100-1080 cm^{-1} , possibili indicatori dello stretching del legame C-O-C (freccia in verde in Fig.52). Si riscontra, inoltre, un picco di ampiezza esigua a circa 1350 cm^{-1} , possibile indicatore dell'interazione dei gruppi amminici (N-H) del chitosano con la superficie (freccia viola in fig.52).

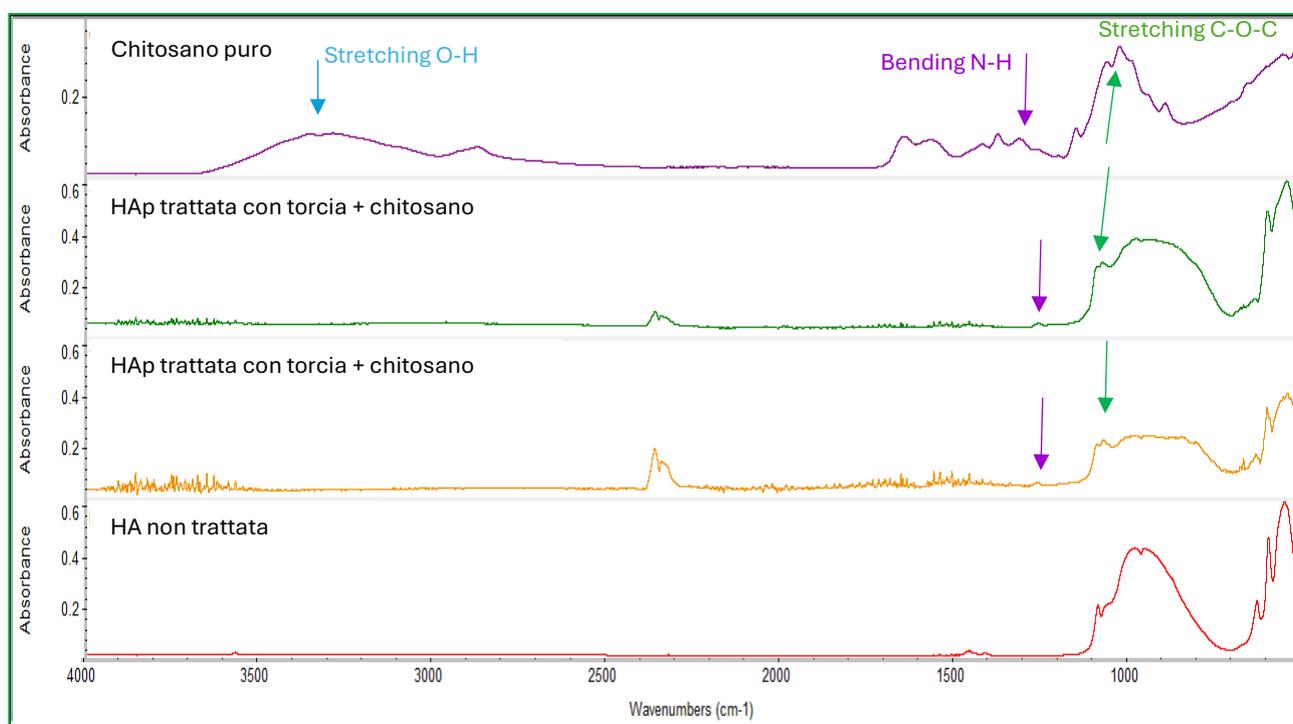


Figura 52. Spettri FTIR di confronto di chitosano puro, HAp trattata mediante torcia e non trattata.

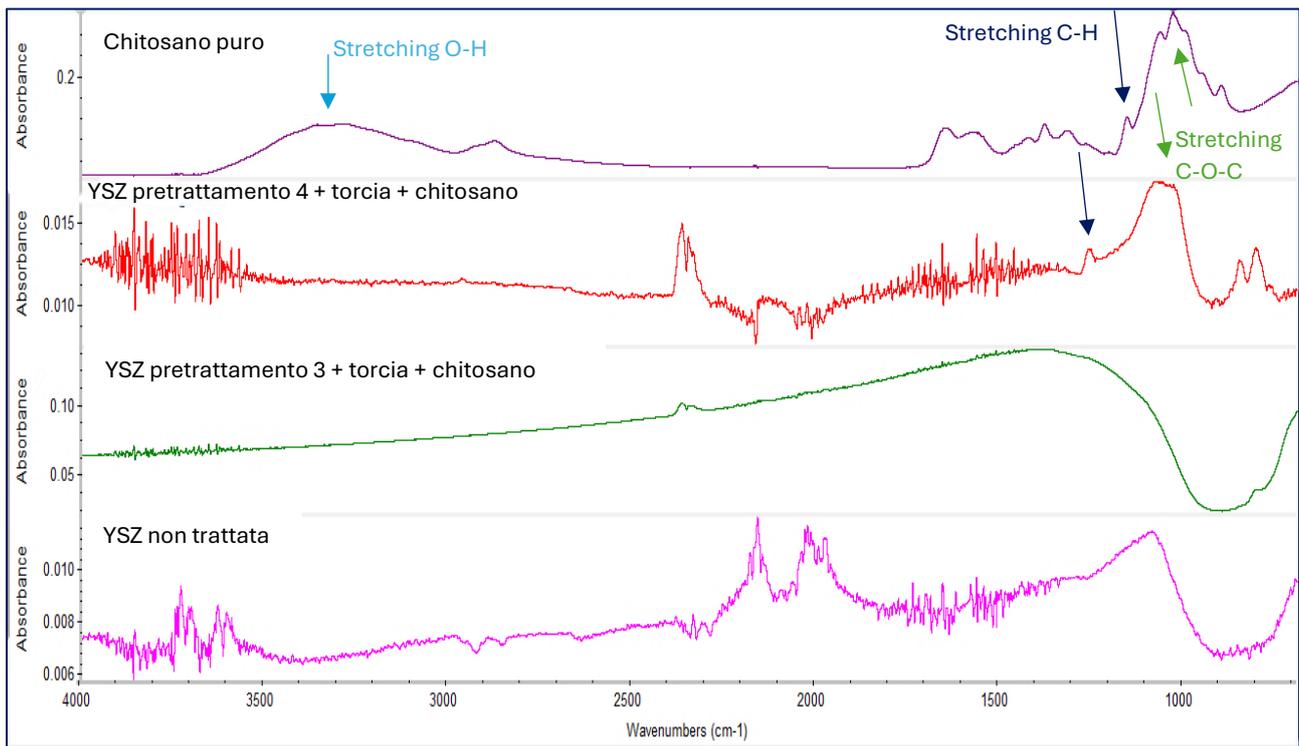


Figura 53. Spettri FTIR di confronto di chitosano puro, YSZ trattata mediante torcia e non trattata.

Risultati leggermente migliori sono stati ottenuti valutando la chimica superficiale dei campioni di zirconia [Fig.53]. Nel dettaglio, è stata analizzato sia il campione sottoposto al Pretrattamento 3 che non ha fornito risultati positivi, sia quello sottoposto al Pretrattamento 4. Quest'ultimo mostra una corrispondenza con lo spettro del chitosano puro: in particolare, si trova un riscontro nelle bande comprese tra $1300-1400\text{ cm}^{-1}$ (freccie blu nella Fig.53), dovute allo stretching del legame C-H, o le bande tra $1080-1030\text{ cm}^{-1}$, relative allo stretching del legame C-O-C (freccia verde in Fig.53), indicatore della struttura polisaccaridica. Quanto detto permette di comprendere come un pretrattamento con elevata tensione e frequenza possa essere decisivo nel favorire la reattività di un determinato materiale.

Discorso analogo vale per i vetri bioattivi sottoposti al Pretrattamento 3 e poi al trattamento con torcia. La problematica principale è rappresentata dal fatto che le bande tipiche del chitosano risultano sovrapposte a quelle dei vetri bioattivi (SBA2 e S53P4) [Fig.54-55]. Nello spettro dello SBA2, tuttavia si riscontra una differenza di morfologia del picco a circa 1100 cm^{-1} , in prossimità della regione di appartenenza del picco relativo allo stretching del legame C-O-C (freccia verde in fig.54). Nel vetro bioattivo S53P4, si riscontra invece un lieve picco a circa 1350 cm^{-1} , possibile indice della presenza del legame amminico N-H (freccia viola fig.55).

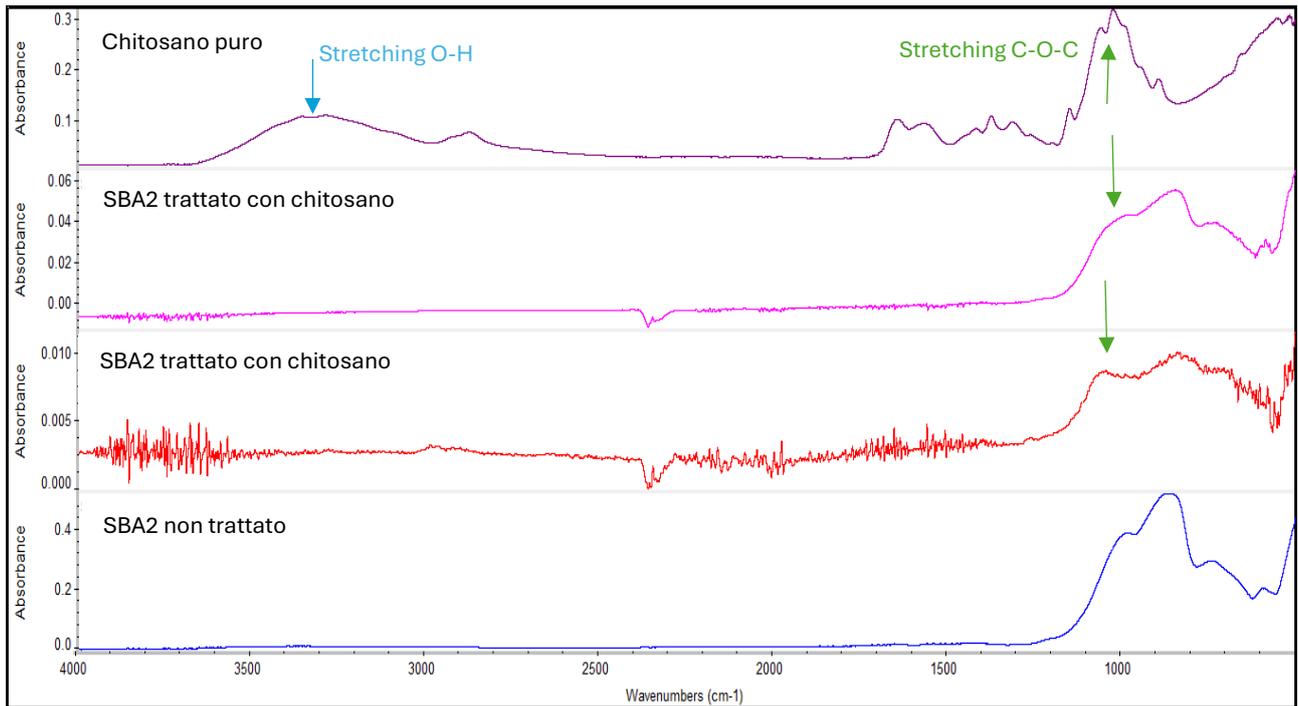


Figura 54. Spettri FTIR di confronto di chitosano puro, SBA2 trattato mediante torcia e non trattato.

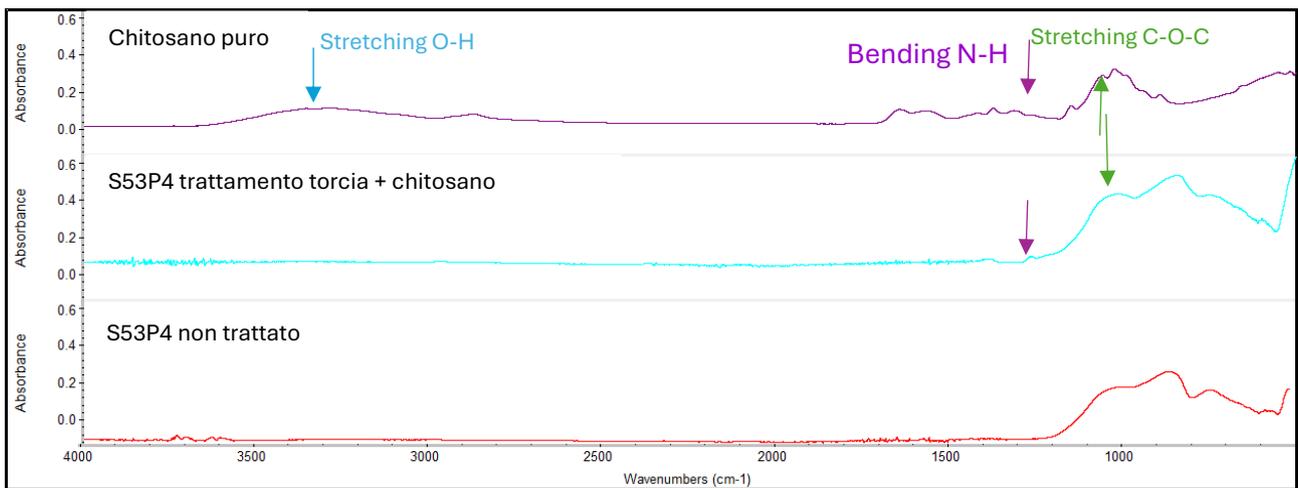


Figura 55. Spettri FTIR di confronto di chitosano puro, S53P4 trattato mediante torcia e non trattato.

Conclusioni e sviluppi futuri

Il presente studio ha permesso di approfondire e ottimizzare i processi di trattamento al plasma per la funzionalizzazione superficiale di vetri bioattivi e materiali ceramici. L'analisi dei parametri di processo ha evidenziato, in particolar modo, come la selezione mirata delle condizioni operative possa influenzare significativamente l'adesione e l'omogeneità del coating. Ad esempio, come dimostrato nel caso della zirconia, un pretrattamento con parametri di tensione e frequenza maggiori, nonché un trattamento prolungato sono aspetti fondamentali per ottenere un'efficace deposizione di coating polimerico di chitosano.

Tuttavia, bisogna sottolineare che non tutte le configurazioni sperimentali realizzate hanno condotto a risultati soddisfacenti. La deposizione del chitosano tramite plasma in configurazione DBD ha presentato delle criticità legate alla gestione della fase liquida, con la presenza di fenomeni di gocciolamento e accumulo all'interno della camera di reazione. Per quanto riguarda invece l'uso della torcia, sebbene questa abbia reso possibile maggiore controllo sulla deposizione della fase polimerica, è stato necessario modificare ulteriormente le condizioni di processo con l'introduzione di un *bubbler*, al fine di ottenere uno strato di chitosano uniforme e non troppo spesso.

In conclusione, si può asserire che il lavoro svolto in questa sede ha dimostrato come il trattamento al plasma mediante torcia si sia rivelato uno strumento più efficace del trattamento in DBD per la realizzazione di coating sottili e uniformi su diversi tipi di materiali, consentendo una deposizione del coating mirata e localizzata, evitando così dispersioni e accumuli indesiderati di materiale. L'impiego del G-Code per il controllo della traiettoria dello strumento permette di ottimizzare il percorso di deposizione, garantendo maggiore riproducibilità. La torcia al plasma permette anche di focalizzare il trattamento sulla sola zona di interesse, evitando il surriscaldamento globale del sistema, introducendo anche la possibilità di realizzare rivestimenti su oggetti tridimensionali.

Alla luce dei risultati ottenuti, sarebbe utile in una successiva fase di studio, testare le impostazioni di processo risultate favorevoli anche sulle altre tipologie di materiali, in particolare sull'idrossiapatite su cui, in questa sede, si è rivelato piuttosto complesso ottenere un coating uniforme. Si rivelerebbe particolarmente utile effettuare anche una valutazione dell'adesione del coating (ad esempio tramite "scratch test") e quantificare lo spessore del coating. Altro aspetto da valutare sarebbe la bioattività dei vetri SBA2 e S53P4 trattati tramite prove in soluzione fisiologica simulata (SBF) per verificare l'influenza del coating nelle cinetiche di reazione. Sarebbe infine opportuno procedere con test antiadesivi in vitro, al fine di indagare il comportamento antibatterico di entrambe le tipologie di materiali.

Bibliografia

1. Murray, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* **399**, 629–655 (2022).
2. Surendranathan, A. O. *An Introduction to Ceramics and Refractories*. (CRC Press, 2014).
3. Shelby, J. E. *Introduction to Glass Science and Technology*. (Royal society of chemistry, 2020).
4. Zachariasbn, W. H. *THE ATOMIC ARRANGEMENT IN GLASS*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (1932).
5. Fernandes, H. R. *et al.* Bioactive glasses and glass-ceramics for healthcare applications in bone regeneration and tissue engineering. *Materials* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ma11122530> (2018).
6. Hench, L. L. & Thompson, I. Twenty-first century challenges for biomaterials. *Journal of the Royal Society Interface* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0151.focus> (2010).
7. BIOMATERIALS AND BIOCOMPATIBILITY. (2018) doi:10.20959/wjpr201810-12253.
8. Vaghi, V., Lunelli, L., Pederzolini, C. & Potrich, C. *Biocompatibilità Dei Materiali Polimerici*.
9. Rahmati, M., Silva, E. A., Reseland, J. E., Heyward, C. & Haugen, H. J. Biological responses to physicochemical properties of biomaterial surface. *Chem Soc Rev* **49**, 5178–5224 (2020).
10. Balakrishnan, B., Hassan, P. A. & Tyagi, A. K. An Introduction to Biomaterials. in *Engineered Biomaterials: Progress and Prospects* 1–57 (World Scientific Publishing Co., 2023). doi:10.1142/9789811272011_0001.
11. Gautam, C., Joyner, J., Gautam, A., Rao, J. & Vajtai, R. Zirconia based dental ceramics: structure, mechanical properties, biocompatibility and applications. *Dalton Transactions* **45**, 19194–19215 (2016).
12. Soon, G., Pingguan-Murphy, B., Lai, K. W. & Akbar, S. A. Review of zirconia-based bioceramic: Surface modification and cellular response. *Ceramics International* vol. 42 12543–12555 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.05.077> (2016).
13. Schünemann, F. H. *et al.* Zirconia surface modifications for implant dentistry. *Materials Science and Engineering: C* **98**, 1294–1305 (2019).
14. HANAWA, T. Zirconia & titanium in dentistry: A review. *Dent Mater J* **39**, 24–36 (2020).
15. Whitlow, J., Paul, A. & Polini, A. Bioactive materials: Definitions and application in tissue engineering and regeneration therapy. in *Advanced Structured Materials* vol. 53 1–17 (Springer Verlag, 2016).
16. Cao, W. & Hench, L. L. *Bioactive Materials*. *Ceramics International* vol. 22 (1996).
17. Orlovskii, V. P., Komlev, V. S. & Barinov, S. M. Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics. *Inorganic Materials* **38**, 973–984 (2002).
18. Novitskaya, E., Karandikar, K., Cummings, K., Mecartney, M. & Graeve, O. A. Hall–Petch effect in binary and ternary alumina / zirconia / spinel composites. *Journal of Materials Research and Technology* **11**, 823–832 (2021).

-
19. Bhat, S., Uthappa, U. T., Altalhi, T., Jung, H.-Y. & Kurkuri, M. D. Functionalized Porous Hydroxyapatite Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Focused Review. *ACS Biomater Sci Eng* **8**, 4039–4076 (2022).
 20. Kattimani, V. S., Kondaka, S. & Lingamaneni, K. P. Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *Bone Tissue Regen Insights* **7**, BTRI.S36138 (2016).
 21. Cilt ; Karasu, B., Yanar, A. O., Koçak, A., Kısacık, Ö. ; B. & Kısacık, Ö. *Bioactive Glasses. El-Cezerî Journal of Science and Engineering* vol. 4 www.dergipark.gov.tr (2017).
 22. Kaur, G. *et al.* A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation. *J Biomed Mater Res A* **102**, 254–274 (2014).
 23. Jones, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater* **9**, 4457–4486 (2013).
 24. Shearer, A., Montazerian, M., Sly, J. J., Hill, R. G. & Mauro, J. C. Trends and perspectives on the commercialization of bioactive glasses. *Acta Biomater* **160**, 14–31 (2023).
 25. Bigoni, M. *et al.* Clinical applications of Bioactive glass S53P4 in bone infections: a systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **23**, (2019).
 26. Lindfors, N. C. *et al.* Bioactive glass S53P4 as bone graft substitute in treatment of osteomyelitis. *Bone* **47**, 212–218 (2010).
 27. Frantzén, J. *et al.* Instrumented spondylodesis in degenerative spondylolisthesis with bioactive glass and autologous bone: a prospective 11-year follow-up. *Clin Spine Surg* **24**, 455–461 (2011).
 28. de Veij Mestdagh, P. D., Colnot, D. R., Borggreven, P. A., Orelia, C. C. & Quak, J. J. Mastoid obliteration with S53P4 bioactive glass in cholesteatoma surgery. *Acta Otolaryngol* **137**, 690–694 (2017).
 29. Bigoni, M. *et al.* Clinical applications of Bioactive glass S53P4 in bone infections: a systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **23**, (2019).
 30. Alotaibi, G. F. Factors Influencing Bacterial Biofilm Formation and Development. *Am J Biomed Sci Res* **12**, 617–626 (2021).
 31. Steward, K. *Gram Positive vs Gram Negative*. <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007> (2019).
 32. Bisht, N. *et al.* Recent advances in copper and copper-derived materials for antimicrobial resistance and infection control. *Current Opinion in Biomedical Engineering* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2022.100408> (2022).
 33. Soltani-Dehnavi, S., Mehdikhani-Nahrkhalaji, M., Rafienia, M. & Doostmohammadi, A. Copper-doped and copper-free bioactive glass nanopowders cytotoxicity and antibacterial activity assessment. *Scientia Iranica* **24**, 1706–1716 (2017).
 34. Babu, M. M. *et al.* ZnO incorporated high phosphate bioactive glasses for guided bone regeneration implants: enhancement of in vitro bioactivity and antibacterial activity. *Journal of Materials Research and Technology* **15**, 633–646 (2021).

-
35. Pandey, A. *et al.* Antioxidant and antibacterial hydroxyapatite-based biocomposite for orthopedic applications. *Materials Science and Engineering C* **88**, 13–24 (2018).
 36. *ristorto alice*. Rivestimenti Antibatterici e Antiadesivi per Dispositivi di Fissazione Temporanea. (politecnico di torino, torino, 2019).
 37. Makableh, Y. F., Momani, N. F., Athamneh, T., Al-Abed, R. & Alshorman, I. Enhanced synergic effect of the antibacterial activity and hydrophobicity of polydimethylsiloxane polymer loaded with titanium dioxide nanoparticles and ciprofloxacin. *Polymer Bulletin* **80**, 3703–3715 (2023).
 38. Kong, Y. *et al.* Asymmetric wettable polycaprolactone-chitosan/chitosan oligosaccharide nanofibrous membrane as antibacterial dressings. *Carbohydr Polym* **304**, 120485 (2023).
 39. Yong, J., Yang, Q., Hou, X. & Chen, F. Emerging Separation Applications of Surface Superwettability. *Nanomaterials* **12**, 688 (2022).
 40. Meng, T. *et al.* A wettability-transformable superhydrophobic composite coating of hydroxyapatite/bismuth sulfide/lauric acid on AZ31B Mg alloy with dual-function of antibacterial and osteogenic properties. *Ceram Int* **49**, 25706–25715 (2023).
 41. Mu, M. *et al.* Influence of Surface Roughness, Nanostructure, and Wetting on Bacterial Adhesion. *Langmuir* **39**, 5426–5439 (2023).
 42. Ivanova, E. P. *et al.* Natural Bactericidal Surfaces: Mechanical Rupture of *Pseudomonas aeruginosa* Cells by Cicada Wings. *Small* **8**, 2489–2494 (2012).
 43. Kelleher, S. M., Habimana, O., Lawler, J. & Casey, E. Cicada Wing Surface Topography: An Investigation into the Bactericidal Properties of. *ACS Applied materials and Interfaces*, *8* (24): 14966–14974 (2015).
 44. Pogodin, S. *et al.* Biophysical Model of Bacterial Cell Interactions with Nanopatterned Cicada Wing Surfaces. *Biophys J* **104**, 835–840 (2013).
 45. Ishak, M. I., Liu, X., Jenkins, J., Nobbs, A. H. & Su, B. Protruding Nanostructured Surfaces for Antimicrobial and Osteogenic Titanium Implants. *Coatings* **10**, 756 (2020).
 46. Slepicka, P. *et al.* Nano-structured and functionalized surfaces for cytocompatibility improvement and bactericidal action. *Biotechnol Adv* **33**, 1120–1129 (2015).
 47. Hasan, J., Raj, S., Yadav, L. & Chatterjee, K. Engineering a nanostructured “super surface” with superhydrophobic and superkilling properties. *RSC Adv* **5**, 44953–44959 (2015).
 48. Teixeira-Costa, B. & Andrade, C. Chitosan as a Valuable Biomolecule from Seafood Industry Waste in the Design of Green Food Packaging. *Biomolecules* **11**, 1599 (2021).
 49. Cheung, R., Ng, T., Wong, J. & Chan, W. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar Drugs* **13**, 5156–5186 (2015).
 50. Lee, J. S. *et al.* In vivo study of chitosan-natural nano hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration. *Int J Biol Macromol* **67**, 360–366 (2014).
 51. Hosseinejad, M. & Jafari, S. M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *Int J Biol Macromol* **85**, 467–475 (2016).
 52. Kulikov, S. N. *et al.* Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: Molecular weight–activity relationship. *Eur J Med Chem* **74**, 169–178 (2014).

-
53. Fernandez-Saiz, P., Lagaron, J. M. & Ocio, M. J. Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. *Food Hydrocoll* **23**, 913–921 (2009).
 54. Roller, S. & Covill, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int J Food Microbiol* **47**, 67–77 (1999).
 55. Devlieghere, F., Vermeulen, A. & Debevere, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol* **21**, 703–714 (2004).
 56. Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K. & Nasri, M. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *Int J Food Microbiol* **185**, 57–63 (2014).
 57. No, H. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol* **74**, 65–72 (2002).
 58. Li, X. *et al.* Chitosan kills Escherichia coli through damage to be of cell membrane mechanism. *Carbohydr Polym* **79**, 493–499 (2010).
 59. Ye, M., Neetoo, H. & Chen, H. Control of Listeria monocytogenes on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiol* **25**, 260–268 (2008).
 60. Byun, S. M., No, H. K., Hong, J., Lee, S. Il & Prinyawiwatkul, W. Comparison of physicochemical, binding, antioxidant and antibacterial properties of chitosans prepared from ground and entire crab leg shells. *Int J Food Sci Technol* **48**, 136–142 (2013).
 61. Park, P.-J., Je, J.-Y., Byun, H.-G., Moon, S.-H. & Kim, S.-K. *Antimicrobial Activity of Hetero-Chitosans and Their Oligosaccharides with Different Molecular Weights*. *J. Microbiol. Biotechnol* vol. 14 (2004).
 62. Mota, J. *et al.* Chitosan/bioactive glass nanoparticle composite membranes for periodontal regeneration. *Acta Biomater* **8**, 4173–4180 (2012).
 63. Altan, D. *et al.* Fabrication of Electrospun Double Layered Biomimetic Collagen–Chitosan Polymeric Membranes with Zinc-Doped Mesoporous Bioactive Glass Additives. *Polymers (Basel)* **16**, 2066 (2024).
 64. Ait Said, H. *et al.* Manufacturing methods, properties, and potential applications in bone tissue regeneration of hydroxyapatite-chitosan biocomposites: A review. *Int J Biol Macromol* **243**, 125150 (2023).
 65. Sellappan, M., Vasumathi, V., Sangeetha, V. O., Venkatachalapathy, B. & Sridhar, T. M. Surface modification of 316L SS by nano chitoSan-ySZ dupLex coatingS for dental applicationS. *Arch. Metall. Mater* **70**, 21–28 (2025).
 66. Chua, P. K., Chena, J. Y., Wanga, L. P. & Huangb, N. Plasma-surface modification of biomaterials. in (2002).
 67. Kogelschatz, U., Eliasson, B., Egli, W. & Konelschatz, U. Principle and Applications. *Journal de Physique IV Proceedings* 4–47 (1997) doi:10.1051/jp4:1997405i.
 68. Chan, C.-M., Ko, T.-M. & Hiraoka, H. Polymer surface modification by plasmas and photons. *Surf Sci Rep* **24**, 1–54 (1996).

-
69. Chappell, P. J. C., Brown, J. R., George, G. A. & Willis, H. A. Surface modification of extended chain polyethylene fibres to improve adhesion to epoxy and unsaturated polyester resins. *Surface and interface analysis* **17**, 143–150 (1991).
 70. Chu, P. K. Recent developments and applications of plasma immersion ion implantation. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena* **22**, 289–296 (2004).
 71. Zeng, Z. M. *et al.* *Process Window and Mechanism of Surface Property Enhancement of 9Cr18 Steel Using Plasma Immersion Ion Implantation*. (1999).
 72. Inagaki, N. *Plasma Surface Modification and Plasma Polymerization*. (CRC Press, 2014). doi:10.1201/9781498710831.
 73. Leng, Y. X. *et al.* Fabrication of Ti–O/Ti–N duplex coatings on biomedical titanium alloys by metal plasma immersion ion implantation and reactive plasma nitriding/oxidation. *Surf Coat Technol* **138**, 296–300 (2001).
 74. Chen, Y., Kang, E. T., Neoh, K. G., Wang, P. & Tan, K. L. Surface modification of polyaniline film by grafting of poly(ethylene glycol) for reduction in protein adsorption and platelet adhesion. *Synth Met* **110**, 47–55 (2000).
 75. Guan, J., Gao, C., Feng, L. & Shen, J. Preparation of functional poly(ether–urethane) for immobilization of human living cells 1. Surface graft polymerization of poly(ether–urethane) with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate and quaternization of grafted membrane. *Eur Polym J* **36**, 2707–2713 (2000).
 76. Lee, S.-D., Hsiue, G.-H., Chang, P. C.-T. & Kao, C.-Y. Plasma-induced grafted polymerization of acrylic acid and subsequent grafting of collagen onto polymer film as biomaterials. *Biomaterials* **17**, 1599–1608 (1996).
 77. Prashar Rayat-Bahra, G. & Vasudev, H. Thermal Sprayed Composite Coatings for Biomedical Implants: A Brief Review. *Journal of Thermal Spray and Engineering* **2**, 50–55 (2020).
 78. Ito, Y. Micropattern immobilization of polysaccharide. *J Inorg Biochem* **79**, 77–81 (2000).
 79. Den Braber, E. T. *et al.* Scanning electron microscopic, transmission electron microscopic, and confocal laser scanning microscopic observation of fibroblasts cultured on microgrooved surfaces of bulk titanium substrata. *J Biomed Mater Res* **40**, 425–433 (1998).
 80. Ha, S.-W., Hauert, R., Ernst, K.-H. & Wintermantel, E. Surface analysis of chemically-etched and plasma-treated polyetheretherketone (PEEK) for biomedical applications. *Surf Coat Technol* **96**, 293–299 (1997).
 81. Chu, P. K. Plasma surface treatment of artificial orthopedic and cardiovascular biomaterials. *Surf Coat Technol* **201**, 5601–5606 (2007).
 82. Chu, P. K. Bioactivity of plasma implanted biomaterials. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* **242**, 1–7 (2006).
 83. Cha, S. & Park, Y. S. Plasma in dentistry. *Clin Plasma Med* **2**, 4–10 (2014).
 84. Hodásová, L. *et al.* Atmospheric pressure plasma liquid assisted deposition of polydopamine/acrylate copolymer on zirconia (Y-TZP) ceramics: a biocompatible and adherent nanofilm. *RSC Adv* **11**, 17360–17368 (2021).

-
85. Ragunathan, R. *Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from F.Solani CBNR BKRR, Synthesis of Their Bionanocomposites and Study of Their Productive Application*. Article in *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (2015).
86. Casasola, R., Rincón, J. M. & Romero, M. Glass–ceramic glazes for ceramic tiles: a review. *J Mater Sci* **47**, 553–582 (2012).